

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7 : C12N 15/12, 15/62, 5/10, C07K 14/51, 7/08, A61K 38/18, 31/70, A61P 19/08	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/47736 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. August 2000 (17.08.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/00637 (22) Internationales Anmeldedatum: 27. Januar 2000 (27.01.00) (30) Prioritätsdaten: 199 06 096.7 13. Februar 1999 (13.02.99) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): OSTEO-GENETICS GMBH [DE/DE]; Auf der Roethe 33, D-97076 Würzburg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SEBALD, Walter [DE/DE]; Meyer-Olberslebenstrasse 7, D-97074 Würzburg (DE). (74) Anwalt: GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR & SCHWANHÄUSSER; Maximilianstrasse 58, D-80538 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Mit geänderten Ansprüchen und Erklärung.</i>
(54) Title: POLYPEPTIDE VARIANTS WITH RAISED HEPARIN-BINDING CAPACITY (54) Bezeichnung: POLYPEPTIDVARIANTEN MIT ERHÖHTER HEPARIN-BINDUNGSFÄHIGKEIT (57) Abstract <p>The invention relates to polypeptide variants with raised heparin-binding capacity. Said raised heparin-binding capacity is achieved by the addition, insertion and/or substitution of an amino acid sequence X₁, X₂, X₃, X₄, X₆ (SEQ ID no. 1 or no. 2). The polypeptide variants provided for in the invention are particularly suitable for the stimulation of chondrogenesis, osteogenesis and wound healing. The invention also relates to nucleic acid molecules coding for said polypeptide variants, host cells containing the nucleic acid molecules and methods for producing the polypeptide variants.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft Polypeptidvarianten mit erhöhter Heparin-Bindungsfähigkeit. Die erhöhte Heparin-Bindungsfähigkeit wird durch die Addition, Insertion und/oder Substitution einer Aminosäuresequenz X₁, X₂, X₃, X₄, X₆ (SEQ ID No. 1 oder No. 2) erreicht. Die erfindungsgemäßen Polypeptidvarianten sind zur Stimulierung der Chondrogenese, Osteogenese und Wundheilung besonders geeignet. Die Erfindung betrifft ferner für diese Polypeptidvarianten kodierende Nukleinsäuremoleküle, diese Nukleinsäuremoleküle umfassende Wirtszellen und Verfahren zum Herstellen der Polypeptidvarianten.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Polypeptidvarianten mit erhöhter Heparin-Bindungsfähigkeit

Die vorliegende Erfindung betrifft Polypeptidvarianten mit erhöhter Heparin-Bindungsfähigkeit. Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung für diese Varianten kodierende Nukleinsäuremoleküle, die Nukleinsäuremoleküle umfassende Wirtszellen und Verfahren zum Herstellen von Polypeptidvarianten und rekombinanten Polypeptidvarianten. Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der Polypeptidvarianten zur Stimulierung der Chondrogenese, Osteogenese und Wundheilung bzw. zur Behandlung von Entzündung und Krebs. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung osteoinduktive Zusammensetzungen, die diese Varianten enthalten.

Zahlreiche biologische Faktoren beeinflussen die Entwicklung und Regeneration von Zellen, Geweben und Organen des menschlichen und tierischen Körpers. Viele dieser Faktoren sind bis heute unbekannt, die von ihnen gesteuerten Prozesse sind noch nicht vollständig verstanden. Auch die Knochenbildung (Osteogenese) ist ein bisher unvollständig verstandener Prozeß; ihr Ablauf ist durch zahlreiche aufeinander folgende Einzelprozesse, wie z. B. Chemotaxis, Mitose und Differenzierung, gekennzeichnet. Chemotaxis bedeutet in diesem Zusammenhang die direkte Einwanderung von Zellen als Antwort auf einen chemischen Gradienten von Signalverbindungen, die aus der unlöslichen demineralisierten Knochenmatrix, die hauptsächlich aus Typ I unlöslichem Collagen besteht, freigesetzt werden. An dieses Typ I unlösliche Collagen bindet Plasma-Fibronektin, welches seinerseits Domänen zur Bindung von Collagen, Fibrin und Heparin aufweist.

An der Steuerung der Osteogenese sind prinzipiell zwei Hauptgruppen von biologisch aktiven Faktoren, die systemisch bzw. die lokal wirkenden Faktoren, beteiligt.

Zur Gruppe der systemisch wirkenden Faktoren gehören beispielsweise die beiden Hormone Parathormon (PTH) und 1,25-Dihydroxy-Vitamin D, die den endogenen Calcium-Spiegel regulieren. Ein weiteres an der Knochenentwicklung beteiligtes Hormon ist Calcitonin, das die Knochenresorption verhindert.

Zu den die Osteogenese regulierenden systemischen Hormone gehören außerdem beispielsweise Östrogene, Androgene, Wachstumshormone, Insulin-like growth factor (IGF), Schilddrüsenhormone und Glucocorticoide.

Zur Gruppe der lokal wirkenden Faktoren gehören (i) Cytokine, die den Knochenabbau bewirken, wie IL-1, Tumornekrose-Faktor (TNF), IL-6, IL-11 und ODF

(Osteoklastendifferenzierungsfaktor, TRANCE);

(ii) Cytokine, die den Knochenabbau verhindern: IL-4, IL-13, IL-18, IFN (Interferon), OPG (Osteoprotegerin) und IL-1ra (Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist);

(iii) Kolonie-stimulierende Faktoren: M-CSF (Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor) und GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen stimulierender Faktor);

(iv) Prostaglandine, Leukotriene und Stickstoffmonoxid; und

(v) Wachstumsfaktoren: IGF (Insulin-like growth factor; Insulin-artiger Wachstumsfaktor), Proteine aus der DVR (Decapentaplegic-Vg-related)-Familie einschließlich der Proteine der TGF- β (transforming growth factor β ; transformierender Wachstumsfaktor β)-Superfamilie, die die Proteine aus der Activin/Inhibin-Familie, MIS (Mullerian Inhibitory Substance; Müllerscher Inhibitor), GDF (growth/differentiation factor; Wachstums-/Differenzierungsfaktor), Nodal und Dorsalin umfaßt; FGF (fibroblast growth factor; Fibroblastenwachstumsfaktor), PDGF (platelet-derived growth factor; Blutplättchen-abstammender Wachstumsfaktor) und PTHrP (PTH-related protein; Parathormon-verwandtes Protein).

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ist die TGF- β Superfamilie von besonderem Interesse.

Die TGF- β Superfamilie umfaßt derzeit mehr als 20 Proteine, wobei die vermuteten Orthologen in verschiedenen Organismen nicht mitgerechnet sind. Neben den TGF- β 's gehören die BMP's (bone morphogenetic proteins), die GDF's (growth differentiation factors) Inhibine/Aktvine und weitere Proteine (Kingsley, 1994) zur Superfamilie. Sie bestehen alle aus zwei Untereinheiten, die fast immer Homodimere aus zwei identischen Monomeren sind und kovalent durch eine Disulfidbrücke verknüpft vorliegen.

Kennzeichnendes Merkmal aller bis jetzt strukturell untersuchten Proteine der TGF- β Superfamilie ist das "TGF- β /BMP Gerüst", das aus einem Cystinknoten, einer α -Helix und mindestens vier β -Strängen pro Monomer besteht, und das im Dimer zu einer charakteristischen Anordnung der Monomeren führt (McDonald und Hendrickson, 1993). Die Aminosäuresequenzen können dabei sehr unterschiedlich sein und weisen zum Teil weniger als 40 % identisch besetzte Positionen auf. Besonders variabel sind die "Loop"-Bereiche sowie die N-terminalen Sequenzen. Andererseits ist für alle Faktoren der TGF- β Superfamilie eine erstaunliche Konservierung von Funktion und Struktur in der Stammesgeschichte gezeigt worden. So weisen sie alle ein als "Cystinknoten" bezeichnetes Strukturelement auf, das aus 3 in allen Proteinen der TGF- β Superfamilie konservierten und gleich angeordneten Disulfidbrücken besteht. Besonders gut untersucht sind neben den TGF- β 's einzelne Vertreter der BMP's, wie BMP-2 und -7, und Vertreter der GDF's, wie GDF-5, die die Entwicklung und Regenerierung von Knochen und Knorpelgewebe in Gang setzen können. So ist z. B. für BMP-2 gezeigt worden, daß dieses sowohl in heterotopen als auch in orthotopen Implantatlagern osteoinduktive Eigenschaften aufweist.

Die Proteine der TGF- β Superfamilie werden in der Zelle zuerst als großes Proprotein synthetisiert, aus dem dann das reife Protein durch Proteolyse entsteht. Das Proprotein scheint nach einer ArgXXArg Erkennungssequenz gespalten zu werden, so daß eine C-terminale Sequenz von etwa 100 bis 140 Aminosäureresten, die das reife Protein darstellt, freigesetzt wird.

Zur Signaltransduktion binden die Faktoren der TGF- β Superfamilie an die extrazellulären Domänen von 2 Typen membranständiger Rezeptoren ihrer Zielzellen, z. B. induzierbarer Knochenmarksstammzellen. Die Typ 2 Untereinheit enthält im cytoplasmatischen Teil eine Protein-Serinkinase, die nach Ligandenbindung in der Typ 1 Untereinheit Serinreste phosphoryliert. Dadurch wird in der Typ 1 Untereinheit ebenfalls eine Protein-Serinkinase aktiviert, die intrazelluläre Signalproteine wie SMAD's phosphorylieren und aktivieren kann. Es gibt Hinweise, daß sowohl die Typ 1 als auch die Typ 2 Untereinheiten als Dimere existieren. Kürzlich ist die Kristallstruktur der extrazellulären Domäne des Typ 2 Untereinheit des Aktivinrezeptors (Act-RII) aufgeklärt wurden. BMP-2, das zu den besten untersuchten Proteinen der TGF- β Familie gehört, bindet an die

Rezeptoruntereinheiten über die strukturell hoch konservierte Domäne nach dem ersten Cystein des Cystinknotens. Die supervariable N-terminale Sequenz vor dem ersten Cystein des Cystinknotens interagiert im BMP-2 nicht direkt mit den Rezeptoruntereinheiten. Die Interaktion von Proteinen der TGF- β Superfamilie mit Typ 1 und Typ 2 Rezeptor Untereinheiten ist zum Teil promiskuitiv und die Spezifitäten überlappen. Es ist noch nicht völlig geklärt, wieweit diese gemeinsame Nutzung von Rezeptor-Untereinheiten oder die Unterschiede im Mechanismus der Rezeptoraktivierung gehen. Aus der gegenwärtigen Literatur geht insbesondere nicht eindeutig hervor, welche Strukturelemente die Spezifität eines Proteins für z.B. eine osteoinduktive Aktivität ausmachen.

Außer mit den Rezeptoruntereinheiten können die Faktoren der TGF- β Superfamilie mit einer Reihe weiterer Proteine interagieren. Dadurch kann die Aktivität der Faktoren moduliert oder gehemmt werden. Fetuin/ α 2-HS Glykoprotein und ein daraus abgeleitetes Peptid (TRH1) bindet BMP-2 und TGF- β , wobei BMP-2 mit höherer Affinität gebunden wird. Die Bindung kompetiert mit der Bindung an den Rezeptor. Das Noggin-Protein aus Säugetieren bindet BMP-2 mit hoher Affinität in Konkurrenz mit dem Rezeptor. Chordin wirkt, wie in Krallenfrosch-Oozyten gezeigt worden ist, als Hemmstoff für BMP-4. Folliculin bindet mit hoher Affinität an Aktivin und BMP-7. Für BMP-2 ist die Fähigkeit, an Heparin zu binden, nachgewiesen worden.

Das therapeutische Potential der Mitglieder der TGF- β Superfamilie ist aufgrund ihrer physiologischen Bedeutung offensichtlich. Hierbei sind insbesondere rekombinant hergestellte Proteine von Interesse, da sie in großer Menge erhalten werden können. Darüber hinaus sind die für sie kodierenden Nukleinsäuren potentielle Gen-Therapeutika.

Somit besteht ein generelles Interesse an Mitgliedern der TGF- β Superfamilie und Varianten mit veränderten biologischen Eigenschaften. Kübler et al. (1999) beschreiben ein BMP-Analogon EHBMP-2, dessen Primärstruktur von der des natürlicherweise vorkommenden humanen BMP-2 dadurch abweicht, daß die mutmaßlich für die starke Heparin-Bindung von BMP-2 verantwortlichen ersten 12 Aminosäuren durch die ersten 13 Aminosäuren von humanem Interleukin-2 ersetzt sind. Das genetisch veränderte BMP-2-Analogon wurde rekombinant in *E. coli* exprimiert. EHBMP-2 weist eine vernach-

lässigbare Affinität zu Heparin und eine höhere biologische Aktivität in verschiedenen Zellkulturen, d.h. *in vitro*, auf. Beim Vergleich der *in vivo*-Aktivität der Variante mit natürlichem BMP-2 zeigte sich jedoch, daß in der Maus durch BMP-2-Konzentrationen ab 4 µg in annähernd allen Proben eine heterotope Knocheninduktion erzeugt wurde, wohingegen zur Erzielung desselben Effekts eine Menge von ca. 40 µg EHBMP-2 benötigt wurde. Weiterhin wurde beobachtet, daß das resultierende Ausmaß der Knochenneubildung bei gleichen Proteinkonzentrationen mit dem natürlichen BMP-2 signifikant größer war als bei seinem BMP-Analogon EHBMP-2.

Die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe besteht somit darin, weitere Polypeptidvarianten bereitzustellen, deren *in vivo* Wirksamkeit derjenigen des Wildtyps entspricht oder erhöht ist. Eine weitere Aufgabe liegt in der Bereitstellung von für die Polypeptidvarianten kodierenden Nukleinsäuren und Vektoren und Wirtszellen, die diese Nukleinsäuren enthalten. Weiterhin sollen Verfahren zum Herstellen der Polypeptidvarianten bereitgestellt werden. Schließlich sollen pharmazeutische Zusammensetzungen, die diese Polypeptidvarianten enthalten, und deren Verwendung bereitgestellt werden.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch eine Polypeptidvariante mit erhöhter Heparin-Bindungsfähigkeit, die dadurch gekennzeichnet ist, daß

(i) an die Aminosäuresequenz eines Polypeptides mit geringer Heparin-Bindungsfähigkeit wenigstens ein Oligopeptid, umfassend die Aminosäuresequenz $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6$, addiert ist und/oder,

(ii) in die Aminosäuresequenz eines Polypeptides wenigstens ein Oligopeptid, umfassend die Aminosäuresequenz $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6$, inseriert ist und/oder

(iii) wenigstens eine natürlicherweise in der Aminosäuresequenz eines Polypeptids vorkommende Oligopeptidsequenz durch ein Oligopeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6$, substituiert ist,

wobei

$X_1 = \text{K, R oder H;}$

$X_2 = \text{K, R oder H;}$

$X_3 = \text{K, R, H oder keine Aminosäure;}$

$X_4 = \text{kein K, R, H, sonst beliebige Aminosäure;}$

$X_5 = \text{kein K, R, H, sonst beliebige oder keine Aminosäure;}$

$X_6 = \text{kein K, R, H, sonst beliebige oder keine Aminosäure, bedeutet (SEQ ID No: 1)}$

oder

$X_1 = \text{K, R oder H;}$

$X_2 = \text{kein K, R, H, sonst beliebige Aminosäure;}$

$X_3 = \text{K, R oder H;}$

$X_4 = \text{kein K, R, H, sonst beliebige Aminosäure;}$

$X_5 = \text{kein K, R, H, sonst beliebige oder keine Aminosäure;}$

$X_6 = \text{kein K, R, H, sonst beliebige oder keine Aminosäure (SEQ ID No: 2),}$

bedeutet.

Im nachfolgenden werden einige Begriffe näher erläutert, um klarzustellen, wie sie im Zusammenhang der vorliegenden Anmeldung verstanden werden sollen.

Der Begriff "Polypeptid", so, wie er nachfolgend in der Beschreibung verwendet wird, umfaßt aus 5 oder mehr Aminosäuren zusammengesetzte Peptide oder Proteine, die wenigstens eine biologische Aktivität aufweisen. Der Begriff umfaßt ferner biologisch aktive Fragmente der Polypeptide, Mutanten und Fusionsproteine davon.

"Polypeptidvariante mit erhöhter Heparin-Bindungsfähigkeit" bedeutet, daß die Polypeptidvariante eine Heparin-Bindungsfähigkeit aufweist, die gegenüber der Heparin-Bindungsfähigkeit des nicht veränderten Polypeptides erhöht ist. Die Heparin-Bindungsfähigkeit allgemein kann beispielsweise durch Plasmonresonanz-Analyse mit Hilfe eines Heparin-beschichteten Trägers gemessen werden. Die einzelnen Versuchsbedingungen sind beispielsweise beschrieben in Ruppert et al., 1996.

Unter der *in vivo* Wirksamkeit wird das Ausmaß der bestimmungsgemäßen Wirkung am Zielort verstanden. Die *in vivo* Wirksamkeit wird bestimmt durch die biologische Aktivität des Proteins in Verbindung mit der Verfügbarkeit des Proteins am Zielort. Sie wird letztendlich gemessen als Wirkung am Zielort. Für die Messung der Wirkung kann auf etablierte Verfahren zurückgegriffen werden. Im Fall von BMP-2 Varianten hat sich die Induktion der ektopen Knochenbildung, beschrieben in Kübler & Urist, 1991 und Kübler et al., 1999, bewährt.

Als "Wachstumsfaktor" wird ein biologisch aktives Polypeptid bezeichnet, das das Wachstum und/oder die Differenzierung von Zellen moduliert.

Insofern nachfolgend auf bestimmte Polypeptide eingegangen wird, so ist die Aminosäuresequenz beispielsweise erhältlich aus der öffentlich zugänglichen Datenbank Entrez (z.Zt.: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>).

Der dem Fachmann bekannte Ausdruck "Homologie" bezeichnet den Grad der Verwandtschaft zwischen zwei oder mehr Polypeptiden, der durch die Übereinstimmung

zwischen den Aminosäuresequenzen mittels bekannter Verfahren, z. B. computergestützter Sequenzvergleiche (Basic local alignment search tool, S.F. Altschul et al., J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410) bestimmt wird. Der Prozentsatz der "Homologie" ergibt sich aus dem Prozentsatz identischer Bereiche in zwei oder mehr Sequenzen unter Berücksichtigung von Lücken oder anderen Sequenzbesonderheiten. In der Regel werden spezielle Computerprogramme mit Algorithmen eingesetzt, die den besonderen Anforderungen Rechnung tragen.

Bevorzugte Verfahren zur Bestimmung der Homologie erzeugen zunächst die größte Übereinstimmung zwischen den untersuchten Sequenzen. Computerprogramme zur Bestimmung der Homologie zwischen zwei Sequenzen umfassen, sind jedoch nicht eingeschränkt auf das GCG Programmpaket, einschließlich GAP (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12 (12) : 387 (1984); Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI)); BLASTP, BLASTIN, und FASTA (Altschul, S. et al., J. Mol. Biol. 215:403-410) (1990)). Das BLASTX Programm kann vom National Centre for Biotechnology Information (NCBI) und aus weiteren Quellen bezogen werden (BLAST Handbuch, Altschul S., et al., NCB NLM NIH Bethesda MD 20894; Altschul, S., et al., Mol. Bio. 215:403-410 (1990)). Auch der bekannte Smith Waterman-Algorithmus kann zur Bestimmung von Homologien verwendet werden.

Bevorzugte Parameter für den Aminosäuresequenz-Vergleich umfassen die nachstehenden:

Algorithmus:	Needleman und Wunsch, J. Mol. Biol 48:443-453 (1970)
Vergleichsmatrix:	BLOSUM 62 aus Henikoff und Henikoff, PNAS USA 89(1992), 10915-10919
Lücken-Wert (Gap Penalty):	12
Lückenlängen-Wert: (Gap Length Penalty):	4
Homologie-Schwellenwert (Threshold of Similarity):	0

Das GAP-Programm ist auch zur Verwendung mit den vorstehenden Parametern geeignet. Die vorstehenden Parameter sind die Fehler-Parameter (default parameters) für Aminosäuresequenz-Vergleiche, wobei Lücken an den Enden den Homologie-Wert nicht verringern. Bei sehr kurzen Sequenzen im Vergleich zur Referenzsequenz kann es weiterhin notwendig sein, den Erwartungswert auf bis zu 100.000 (expectation value) zu erhöhen und gegebenenfalls die Wortlänge (word size) auf bis zu 2 zu verkleinern.

Weitere beispielhafte Algorithmen, Lücken-Öffnungs-Werte (gap opening penalties), Lückenausdehnungs-Werte (gap extension penalties), Vergleichsmatrizen einschließlich der im Programm-Handbuch, Wisconsin-Paket, Version 9, September 1997, genannten können verwendet werden. Die Auswahl wird von dem durchzuführenden Vergleich abhängen und weiterhin davon, ob der Vergleich zwischen Sequenzpaaren, wobei GAP oder Best Fit bevorzugt sind, oder zwischen einer Sequenz und einer umfangreichen Sequenz-Datenbank, wobei FASTA oder BLAST bevorzugt sind, durchgeführt wird.

Eine mit dem oben genannten Algorithmus ermittelte Übereinstimmung von 60 % wird im Rahmen dieser Anmeldung als 60 % Homologie bezeichnet. Entsprechendes gilt für höhere Homologiegrade.

"His-Tag" bedeutet eine Sequenz von wenigstens 6 Histidin-Aminosäuren, die durch entsprechende Klonierung und Fusion mit einer exprimierbaren Sequenz zu einem Fusionsprotein mit wenigstens 6 His-Resten am NH₂-Terminus führt, das leicht durch Komplexierung mit einer Ni²⁺-Säule aufgereinigt werden kann.

Unter einem "heterologen Gen" ist der kodierende Bereich eines Strukturgens zu verstehen, der entweder nicht unter der Kontrolle des eigenen (homologen) Promotors oder nicht in dem Organismus, aus dem er abgeleitet ist, oder weder unter der Kontrolle des eigenen Promotors noch im ursprünglichen Organismus exprimiert wird.

"Klonierung" soll alle im Stand der Technik bekannten Klonierungsmethoden umfassen, die hier zum Einsatz kommen könnten, die jedoch nicht alle im einzelnen beschrieben werden, weil sie zum selbstverständlichen Handwerkszeug des Fachmanns gehören.

Unter "rekombinanter Expression in einer geeigneten Wirtszelle" sollen alle im Stand der Technik bekannten Expressionsmethoden in bekannten Expressionssystemen verstanden werden, die hier zum Einsatz kommen könnten, jedoch nicht alle im einzelnen beschrieben werden, weil sie zum selbstverständlichen Handwerkszeug des Fachmanns gehören.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß eine erfindungsgemäße Polypeptidvariante eine höhere Heparin-Bindungsfähigkeit gegenüber dem nicht veränderten Polypeptid dadurch aufweist, daß wenigstens ein Oligopeptid, das eine erfindungsgemäße Aminosäuresequenz umfaßt, an das Polypeptid addiert und/oder in das Polypeptid inseriert wird und/oder einige der Aminosäuren als Polypeptide ersetzt. Es konnte gezeigt werden, daß im Vergleich zum nicht veränderten Polypeptid die Menge der an Heparin gebundenen Varianten größer ist und daß außerdem die Abdissoziierung der Varianten von Heparin verringert ist. Da Heparin-ähnliche Strukturen integrale Bestandteile der Knochenstruktur sind, weisen die erfindungsgemäßen Polypeptidvarianten auch eine erhöhte Bindungsfähigkeit für Knochenstrukturen auf. Diese Eigenschaft ist besonders wichtig für regenerative Vorgänge in der Knochenstruktur, wobei in diesem Fall die beteiligten Polypeptide an der Knochenmorphogenese (Osteogenese) mitwirken. Es konnte dabei gezeigt werden, daß die erfindungsgemäßen Polypeptidvarianten die Heparinbindungsfähigkeit um den Faktor 30, mindestens aber den Faktor 10 steigern konnten. Die erhöhte Heparinbindungsfähigkeit wiederum führte zu einer dramatisch gesteigerten *in vivo* Wirksamkeit, wie z. B. durch die Figur 8 belegt.

Wie erwähnt, wird die Wirkung der an der Osteogenese beteiligten Polypeptide durch Rezeptoren vermittelt, die u.a. auf der Oberfläche von induzierbaren Knochenmarksstroma-Stammzellen vorkommen. Diese haben die Fähigkeit, nach Einwirkung eines induktiven Signals von morphogenetischen Proteinen oder demineralisierter Knochenmatrix, Knochenzellen auszubilden. Es wird angenommen, ohne an diese Theorie gebunden sein zu wollen, daß die Erhöhung der Heparin-Bindungsfähigkeit von Polypeptiden, insbesondere von osteoinduktiven Polypeptiden, zur Erhöhung der lokalen

Konzentration von osteogenetischen Proteinen in unmittelbarer Nähe des Ortes der Knochenneubildung führt.

Da jedoch Heparin mit dem zellulären Rezeptor des Polypeptides um die Polypeptidvariante konkurriert, ist zunächst davon auszugehen, daß die Erhöhung der Heparin-Bindungsfähigkeit der Polypeptidvariante zu einer Abnahme der für den Polypeptidspezifischen Rezeptor verfügbaren Polypeptid-Menge und damit zu einer verminderten Signaltransduktion führt.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß die biologische Verfügbarkeit der Polypeptidvariante bei gleichzeitiger Erhöhung der Heparin-Bindungsfähigkeit nicht beeinträchtigt ist, daß vielmehr die erhöhte Heparin-Bindungsfähigkeit mit einer Erhöhung der lokalen Konzentration von für den spezifischen Rezeptor verfügbarem Polypeptid korreliert.

Weiterhin wurde überraschenderweise gefunden, daß die Qualität des durch die Polypeptidvariante *in vivo* gebildeten Knochens gegenüber derjenigen, die durch das nicht veränderte Polypeptid gebildet wurde, erhöht ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Aminosäuresequenz an den N-Terminus des reifen Polypeptids addiert und/oder durch Substitution bzw. Insertion in den N-terminalen Bereich des Polypeptides eingefügt. Der N-terminale Bereich bedeutet hierbei die ersten 20, vorzugsweise die ersten fünf, N-terminalen Aminosäuren.

Sofern das Polypeptid zur TGF- β Superfamilie gehört, sind die reifen Polypeptide, z. B. ausgehend von BMP-2, wie folgt ermittelbar: Eine Suche in der "Swiss-Prot" Datenbank (derzeit <http://expasy.hcuge.ch/cgi-bin/sprot-search-de>) mit dem Suchwort "BMP-2" ergibt unter der Nummer P12643 die Aminosäuresequenz des gesamten Proproteins von humanem BMP-2. Daraus läßt sich unter "bone morphogenetic protein 2" die Sequenz für das reife Protein auswählen. Sie entspricht den Aminosäureresten 283-396. Um die anderen Proteine der TGF- β Superfamilie zu identifizieren, wird diese Sequenz 283-396

unter "BLAST2" bei EMBnet-CH (Lausanne, Schweiz) eingereicht. Dort wird sie gegen die Datenbanken Swiss-Prot + TrEMBL + TrEMBL_New mit Hilfe des Programms "blastp" abgesucht. Dabei wird die Vergleichsmatrix Blosum 62 verwendet, und es werden die 250 am nächsten verwandten Proteine ermittelt. Das Programm liefert die entsprechenden Identitäts-Nummern der Swiss-Prot Datenbank, unter denen sich die Aminosäuresequenzen der gesamten Proproteine aufrufen lassen. Die Sequenzabschnitte für die reifen Proteine sind jeweils angegeben. Sie ließen sich sonst auch ableiten, da die reifen Proteine gewöhnlich nach der Erkennungssequenz RXXR abgespalten werden (X bedeutet hier eine beliebige Aminosäure).

Alle Polypeptide der TGF- β Superfamilie sind, wie schon erwähnt, durch ein Strukturelement gekennzeichnet, das als "Cystinknoten" bezeichnet wird (McDonald und Hendrickson, 1993). Gehört das Polypeptid zu dieser Superfamilie, so gilt der gesamte Bereich vor dem Cystinknoten als N-terminaler Bereich, und die erfindungsgemäße Aminosäuresequenz wird vorzugsweise vor dem Cystinknoten eingefügt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Oligopeptid, das die erfindungsgemäße Aminosäuresequenz umfaßt, ein bis viermal durch Addition, Insertion und/oder Substitution in das Polypeptid eingefügt, wobei jeweils ein oder mehrere Kopien des Oligopeptids an einer oder mehreren Positionen in das Polypeptid eingefügt werden können.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform hat das Oligopeptid die Sequenz RKRA (SEQ ID No. 3) oder die Sequenz RKRAKHKQ (SEQ ID No. 4).

Weiterhin ist bevorzugt, daß die Polypeptidvariante eine für die rekombinante Expression relevante Sequenz am N-Terminus umfaßt, wobei die für die rekombinante Expression relevante Sequenz M oder MZ ist, und M Methionin und Z eine oder mehrere beliebige Aminosäuren bedeutet. MZ kann beispielsweise eine Signalsequenz darstellen, wie sie für zahlreiche prokaryontische und eukaryontische Proteine dem Fachmann bekannt ist. Es kann sich dabei um auf das jeweilige Expressionssystem zugeschnittene Signalsequenzen handeln oder aber um die "homologen"

Signalsequenzen, d.h., die zu dem Protein natürlicherweise gehörenden Signalsequenzen, sowie schließlich um eine Kombination einer beliebigen Signalsequenz mit gezielt eingefügten Proteaseschnittstellen, etc.

Ferner ist bevorzugt, daß die Polypeptidvariante ein His-Tag umfaßt. Das His-Tag am NH₂-Terminus der Polypeptidvariante erleichtert die Aufreinigung des Proteins wesentlich, da diese Aufreinigung an einer Nickel-Säule durch Chelat-Bildung durchgeführt werden kann.

Das der Polypeptidvariante zugrundeliegende Polypeptid weist eine biologische Aktivität auf. Hierbei sind grundsätzlich sämtliche biologischen Aktivitäten von Interesse, bei denen die Wirksamkeit eines Polypeptides mit biologischer Aktivität durch das Wegdiffundieren von negativ geladenen intra- und extrazellulären Strukturen limitiert ist. Vorzugsweise sind diese negativ geladenen Strukturen Strukturen der extrazellulären Matrix, die aufgrund ihres Anteils an Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen, wie Heparansulfat, Chondroitinsulfat, Keratansulfat und Dermatan-sulfat, negativ geladen sind. In einer bevorzugten Ausführungsform reguliert die biologische Aktivität die Entwicklung bzw. Differenzierung von Zellen, Geweben und Organen des menschlichen oder tierischen Körpers.

Besonders bevorzugt ist hierbei, daß das der Polypeptidvariante zugrundeliegende Polypeptid die Knochenbildung reguliert (osteogenetische Aktivität). Die osteogene-tische Aktivität kann hierbei beispielsweise durch den Wachstumsfaktor-abhängigen Einbau von ³⁵SO₄ in Proteoglykan-Strukturen von Gliedmaßenknospen aus Hühnerembryonen bestimmt werden. Sinnvollerweise wird dazu ein Konzentrationsbereich für das BMP-Protein gewählt, der es ermöglicht, sowohl die maximale Zellantwort als auch die EC₅₀ (Konzentration, bei der 50% des maximalen Einbaus erreicht werden) zu bestimmen. Die Assay-Bedingungen sind angegeben in Ruppert et al., 1996.

Alternativ kann die myoblastäre Maus-Zelllinie C2C12 verwendet werden, um die BMP-abhängige Induktion der Alkalischen Phosphatase zu bestimmen (Katagiri et al., 1994). Auch mit diesem Test können die maximale Zellantwort und die EC₅₀ bestimmt werden.

Bevorzugt ist das Polypeptid aus der Hormone, Cytokine und Wachstumsfaktoren umfassenden Gruppe ausgewählt. Hierbei sind besonders bevorzugt:

Parathormon (PTH); Calcitonin; Wachstumshormon; Insulin-like growth factor (IGF); Cytokine, die den Knochenabbau bewirken, wie IL-1, Tumornekrose-Faktor (TNF), IL-6, IL-11 und ODF (Osteoklastendifferenzierungsfaktor, TRANCE); Cytokine, die den Knochenabbau verhindern: IL-4, IL-13, IL-18, IFN (Interferon), OPG (Osteoprotegerin) und IL-1ra (Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist); Kolonie-stimulierende Faktoren: M-CSF (Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor) und GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen stimulierender Faktor); und Wachstumsfaktoren: IGF (Insulin-like growth factor; Insulin-artiger Wachstumsfaktor); Proteine aus der DVR-Familie einschließlich der Proteine aus der TGF- β (transforming growth factor β ; transformierender Wachstumsfaktor β)-Superfamilie, die wiederum die Activin/Inhibin-Familie, MIS (Mullerian Inhibitory Substance; Müllerscher Inhibitor), die GDF (growth/differentiation factor; Wachstums-/Differenzierungsfaktor)-Familie, Nodal und Dorsalin umfaßt; FGF (fibroblast growth factor; Fibroblastenwachstumsfaktor); PDGF (platelet-derived growth factor; Blutplättchen-abstammender Wachstumsfaktor) und PTHrP (PTH-related protein; Parathormon-verwandtes Protein).

Besonders bevorzugt umfaßt das Polypeptid Mitglieder der TGF β -Superfamilie, Activin/Inhibin-Familie, MIS, GDF-Familie, Nodal und Dorsalin, sowie Mitglieder der BMP-Familie, insbesondere BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7/OP-1 oder BMP-8/OP-2, sowie BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, BMP-13, BMP-14 und BMP-15.

Die vorstehende Auswahl von Wachstumsfaktoren ist erfindungsgemäß von besonderem Interesse, da die Beteiligung dieser Faktoren an der Osteogenese bekannt ist (Reddi, 1998); die Verwendung der erfindungsgemäßen Varianten dieser Faktoren führt zu einer erhöhten Heparin-Bindungsfähigkeit unter Beibehaltung der osteoinduktiven Eigenschaften.

Sofern das Polypeptid der TGF- β Superfamilie angehört und somit die vorstehend erläuterte "Cystinknoten"-Struktur aufweist, wird die erfindungsgemäße Aminosäuresequenz

bevorzugt vor den Cystinknoten in die Polypeptidsequenz eingefügt. Besonders bevorzugte Positionen sind beispielsweise bei BMP-2 die Positionen zwischen den Aminosäureresten 2 und 3, 6 und 7, 10 und 11 sowie 13 und 14 des reifen Proteins. Aufgrund der Homologie zwischen den Mitgliedern der TGF- β Familie, insbesondere der konservierten Anordnung der Cysteine, kann der Fachmann den genannten Proteinen entsprechende Positionen in anderen TGF- β Familienmitgliedern bestimmen.

Das Polypeptid kann ferner ein Hormon, ein Cytokin oder ein Wachstumsfaktor sein, der eine Addition, Substitution, Insertion, Inversion und/ oder Deletionen aufweist, wobei das die Addition, Substitution, Insertion, Inversion und/oder Deletion aufweisende Polypeptid wenigstens 10 %, vorzugsweise wenigstens 50 % und insbesondere wenigstens 90 % der biologischen Aktivität, im Fall osteogenetischer Polypeptide der osteogenetischen Aktivität des ursprünglichen Polypeptids aufweist. Die biologische Aktivität kann hierbei allgemein mit jedem dem Fachmann bekannten Verfahren zur Messung der biologischen Aktivität des Polypeptides bestimmt werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die durch Addition, Substitution, Insertion, Inversion oder Deletion erhaltenen Polypeptide wenigstens 50 %, vorzugsweise 75 % und insbesondere 90 % homolog zur Aminosäuresequenz des vollständigen ursprünglichen Polypeptids. Dabei kann eine wenigstens 10%ige biologische Aktivität mit einer mindestens 50%igen, mindestens 75%igen oder mindestens 90%igen Homologie korrelieren. Gleiches gilt für eine wenigstens 50%ige oder wenigstens 90%ige biologische Aktivität.

Besonders bevorzugt sind Polypeptidvarianten mit der Aminosäuresequenz SEQ ID No 5 (T3) oder SEQ ID No 6 (T4). Diese Polypeptidvarianten entsprechen den in den Beispielen verwendeten Polypeptidvarianten, die eine erhöhte Wirksamkeit bei gleicher Konzentration und eine verbesserte Qualität des induzierten Knochens zeigen, wobei unter verbesserter Qualität insbesondere eine dichtere Knochenmatrix und damit eine erhöhte biomechanische Belastbarkeit zu verstehen sind.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die erfindungsgemäß hergestellte Polypeptidvariante modifiziert. Die Modifikationen umfassen hierbei die Di-, Oligo- und Polymerisierung des monomeren Ausgangsprodukts, beispielsweise durch Quervernetzung, z.B. durch Dicyclohexylcarbodiimid oder Pegylierung oder Assoziation (self assembly). Die somit hergestellten Di-, Oligo- und Polymere können voneinander beispielsweise durch Gelfiltration abgetrennt werden. Weitere Modifikationen umfassen Seitenketten-Modifikationen, beispielsweise von ϵ -Amino-Lysin-Resten der Polypeptidvariante, oder Amino- bzw. Carboxy-terminale Modifikationen. Schließlich umfaßt der Begriff Modifikationen posttranslationale Ereignisse, z.B. die Glykosylierung oder die partielle oder vollständige Deglykosylierung des Proteins.

Die Erfindung stellt ferner Nukleinsäuremoleküle bereit, die eine für eine erfindungsgemäße Polypeptidvariante kodierende Nukleinsäuresequenz umfassen.

Die im erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül enthaltene Nukleinsäuresequenz kann von einer genomischen DNA, cDNA oder synthetischen DNA abgeleitet sein, wobei unter synthetischen DNA-Sequenzen auch solche verstanden werden, die modifizierte Internukleosid-Bindungen enthalten. Weiterhin kann es sich bei den Nukleinsäuresequenzen um RNA-Sequenzen handeln, was z.B. für die Expression mittels rekombinanter RNA-Vektorsysteme erforderlich sein kann.

Bevorzugte Nukleinsäuremoleküle umfassen eine für eine der Polypeptidvarianten T3 oder T4 kodierende Nukleinsäure. Beispiele solcher Nukleinsäuren sind im Sequenzprotokoll unter SEQ ID No. 7 (T3) und SEQ ID No. 8 (T4) angegeben. Es versteht sich von selbst, daß anstelle der in SEQ ID No. 7 oder SEQ ID No. 8 angegebenen Nukleinsäuresequenzen solche, die auf einer Degeneration des genetischen Codes beruhen, ebenfalls verwendet werden können. Bevorzugt sind in diesem Zusammenhang Nukleinsäuresequenzen, die im Hinblick auf die Expression in einem bestimmten Wirtsorganismus eine an den Codon-Gebrauch dieses Wirtsorganismus adaptierte Codon-Auswahl aufweisen. Zu den vorgenannten Sequenzen komplementäre Sequenzen sind von der Erfindung ebenfalls umfaßt.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül einen zur Expression geeigneten Promotor, wobei die Nukleinsäuresequenz unter der Kontrolle des Promotors steht. Die Wahl des Promotors hängt vom zur Expression verwendeten Expressionssystem ab. Generell sind induzierbare Promotoren, wie z.B. der Metallothionein-Promotor, bevorzugt, jedoch sind auch konstitutive Promotoren möglich.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt das Nukleinsäuremolekül wenigstens einen Teil eines Vektors, insbesondere regulatorische Regionen, wobei der Vektor ausgewählt sein kann aus Bakteriophagen wie λ -Derivaten, Adenoviren, Vacciniaviren, Baculoviren, SV40-Virus, Retroviren, Plasmiden, wie Ti-Plasmide von *Agrobacterium tumefaciens*, YAC-Vektoren und BAC-Vektoren. Bevorzugte Vektoren sind pR^{TS}pRC 109 (Weigel et al., 1989) und pRBSII PN₂₅X/o (Stueber, 1994).

Ferner stellt die Erfindung Wirtszellen bereit, die das Nukleinsäuremolekül enthalten und die zur Expression des Nukleinsäuremoleküls geeignet sind. Im Stand der Technik sind zahlreiche prokaryontische und eukaryontische Expressionssysteme bekannt, wobei die Wirtszellen beispielsweise ausgewählt sind aus prokaryontischen Zellen, wie *E. coli* oder *B. subtilis*, aus eukaryontischen Zellen, wie Hefezellen, Pflanzenzellen, Insektenzellen und Säugerzellen, z.B. CHO-Zellen, COS-Zellen oder HeLa-Zellen, sowie Derivaten davon. Im Stand der Technik sind beispielsweise bestimmte CHO-Produktionslinien bekannt, deren Glykosylierungsmuster im Vergleich zu CHO-Zellen verändert sind. Die durch die Verwendung Glykosylierung-effizienter oder Glykosylierung-verringelter Wirtszellen erhaltenen Polypeptidvarianten verfügen möglicherweise über eine veränderte räumliche Struktur, die gegebenenfalls zu einer erhöhten biologischen Aktivität gegenüber der glykosylierten Polypeptidvariante führen kann, sofern das Polypeptid biologische Aktivität aufweist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner ein Verfahren zum Herstellen einer Polypeptidvariante mit erhöhter Heparin-Bindungsfähigkeit, umfassend das Addieren wenigstens eines Oligopeptides, enthaltend eine Aminosäuresequenz, die aus: SEQ ID No: 1 und SEQ No: 2 ausgewählt ist, an die Aminosäuresequenz eines Polypeptids,

und/oder das Inserieren wenigstens eines Oligopeptids, das eine Aminosäuresequenz enthält, die aus: SEQ ID No: 1 und SEQ No: 2 ausgewählt ist, in die Aminosäuresequenz des Polypeptids; und/oder das Substituieren wenigstens einer natürlicherweise in der Aminosäuresequenz vorkommenden Oligopeptidsequenz durch ein Oligopeptid, das eine Aminosäuresequenz enthält, die aus: SEQ ID No: 1 und SEQ No: 2 ausgewählt ist.

Das Verfahren kann durch chemische Partial- oder Total-Synthese, unter Verwendung der bekannten Merrifield-Synthese oder durch enzymatische Synthese durchgeführt werden. Weiterhin kann das Verfahren gentechnologisch, d.h. durch rekombinante Expression durchgeführt werden. Die Erfindung umfaßt ferner auch die Kombination aus chemischen/enzymatischen und gentechnologischen Verfahren.

In einer bevorzugten Form umfaßt das Verfahren:

a) *in vitro* Mutagenese einer für ein Polypeptid kodierenden Nukleinsäure, so daß (i) an die für das Polypeptid kodierende Nukleinsäure wenigstens eine Nukleinsäure addiert wird, die für ein Oligopeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die aus SEQ ID No: 1 und SEQ ID No: 2 ausgewählt ist; und/oder (ii) in die für das Polypeptid kodierende Nukleinsäure wenigstens eine Nukleinsäure inseriert wird, die für ein Oligopeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, ausgewählt aus SEQ ID No: 1 und 2, enthält und/oder (iii) wenigstens eine natürlicherweise in der für das Polypeptid kodierenden Nukleinsäure vorkommende Nukleinsäuresequenz durch eine Nukleinsäuresequenz substituiert wird, die für ein Oligopeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die aus: SEQ ID No: 1 und SEQ ID No: 2 ausgewählt ist;

b) Einklonieren der mutierten Nukleinsäure in einen geeigneten Expressionsvektor;

c) Transformieren/Transfizieren einer geeigneten Wirtszelle mit dem erhaltenen Expressionsvektor;

d) Kultivieren der transformierten/transfizierten Wirtszelle unter zur Expression geeigneten Bedingungen;

e) Isolieren und gegebenenfalls Renaturieren der Expressionsprodukte.

Dem Fachmann sind zahlreiche Verfahren zur Expression von DNA-Sequenzen bekannt; vgl. Recombinant Gene Expression Protocols in Methods in Molecular Biology, engl. Text, Band 62, Humana Press Totowa, New Jersey (1995). Die Expression kann sowohl konstitutiv als auch induzierbar sein, wobei Induktoren wie beispielsweise IPTG und Zn^{2+} dem Fachmann bekannt sind.

Die der Mutagenese zuzuführenden Nukleinsäuresequenzen, die für ein Polypeptid mit biologischer Aktivität kodieren, sind beispielsweise durch ein Screening von cDNA-Banken, die aus Gewebe hergestellt wurden, die das Polypeptid exprimieren, oder von genomischen DNA-Banken mit einer nachweisbar markierten spezifischen Sonde erhältlich. Die Identifizierung positiver cDNA-/genomischer DNA-Klone erfolgt gemäß Standardverfahren; vgl. Maniatis et al., Molecular Cloning (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press. Die Nukleinsäuresequenz, die für das Oligopeptid kodiert, das die erfindungsgemäße Aminosäuresequenz enthält, kann beispielsweise durch Kassettenmutagenese oder durch rekombinante Polymerasekettenreaktion (PCR) in die doppelsträngige DNA eingefügt werden. Die entsprechenden Methoden sind dem Fachmann bekannt (z.B. Wang et al., 1997; Ruppert et al., 1996). Die erhaltene mutierte doppelsträngige DNA wird sodann in einen Expressionsvektor eingefügt.

Die verwendbaren Vektoren und Wirtszellen wurden bereits vorstehend beschrieben. Wird die Expression in *E. coli* durchgeführt, so kann das Protein aus dem unlöslichen Anteil der Zellen durch Guanidiniumhydrochlorid herausgelöst werden (Ruppert et al., 1996). Sodann wird die Polypeptidvariante renaturiert und über Chromatographie gereinigt. Für die Reinigung von Proteinen aus der TGF- β Superfamilie ist ein pH-Wert von 8 bevorzugt, wobei bevorzugt bei hoher Salzkonzentration (1 M NaCl), in Gegenwart von schwachen Detergentien und mit Redoxmediatoren gearbeitet wird.

Alternativ kann die Polypeptidvariante aus dem Kulturmedium erhalten werden, wenn ein geeigneter Expressionsvektor verwendet wird, der zur Expression der Polypeptidvariante mit einer geeigneten sekretorischen Signalsequenz führt.

Die Erfindung stellt weiterhin pharmazeutische Zusammensetzungen bereit, die mindestens eine erfindungsgemäße Polypeptidvariante und physiologisch verträgliche Zusatzstoffe, die im Stand der Technik bekannt sind, enthalten. Bevorzugt ist hierbei, daß die Polypeptidvariante von einem biologisch aktiven Polypeptid abgeleitet ist, beispielsweise von einem Cytokin oder einem Wachstumsfaktor. Besonders bevorzugt sind hierbei Hormone, Cytokine und Wachstumsfaktoren, die an der Osteogenese beteiligt sind. Die erhöhte Heparin-Bindungsfähigkeit der Polypeptidvarianten führte hierbei zu einer verringerten Diffusion der therapeutisch wirksamen Polypeptidvarianten von der Heparin-Komponente der demineralisierten Knochenmatrix und somit zu einer erhöhten lokalen Konzentration therapeutisch wirksamer Stoffe.

Allgemein wurde auch eine erhöhte Bindungsfähigkeit für extrazelluläre Matrix-Strukturen und Zelloberflächen beobachtet. Die therapeutisch wirksamen Polypeptidvarianten sind somit verwendbar zur Vorbeugung und/oder Behandlung von Krankheiten, an denen die extrazelluläre Matrix oder Zelloberflächen beteiligt oder benachbart sind.

Gehören die den Polypeptidvarianten zugrundeliegenden Polypeptide zur DVR-Familie, so sind sie zur Förderung des Knochenwachstums und -reparatur geeignet. Die Beteiligung von GDF-5 an der Knorpel-Bildung ist beschrieben und für die Sehnen-Entwicklung wird sie postuliert. Somit sind von GDF-5 abgeleiteten Polypeptidvarianten zur Knorpel- und Sehnen-Reparatur geeignet. BMP-7/OP-1 unterdrückt die Produktion von GDF-5, welches möglicherweise einen Mechanismus zum Ausgleich der Knochen- und Knorpel-Bildung darstellt. Somit weisen von BMP-7 abgeleiteten Polypeptidvarianten regulatorische Eigenschaften in bezug auf die Knochen- und Knorpel-Bildung auf.

BMP-7 ist an der Nieren- und Augen-Entwicklung, BMP-6 an der Haut- und BMP-2 an der Herz-Entwicklung beteiligt. Somit können gemäß der vorliegenden Erfindung die von

BMP abgeleiteten Polypeptidvarianten zur Regulation der Nieren-, Augen-, Haut- und Herz-Entwicklung verwendet werden.

Weiterhin wird die Angiogenese durch GDF-5 induziert. Daher sind GDF-5 von abgeleiteten Polypeptidvarianten sinnvoll zur Stimulierung der Angiogenese einsetzbar.

Gehören die Polypeptide der Polypeptidvarianten zur TGF- β -Familie, so sind die therapeutisch wirksamen Polypeptidvarianten zur Immunsuppression, Entzündungshemmung, Stimulierung der Knochen- und Knorpel-Bildung geeignet. Sie sind aufgrund der verstärkten Ablagerung von Extrazellulärmatrix-Komponenten wie Collagenen, Fibronectin, Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen zur Wundheilung verwendbar.

Weiterhin sind die Polypeptidvarianten auf TGF- β -Basis zur Verhinderung der Retina-Ablösung verwendbar. Ferner sind sie vorteilhaft anwendbar bei oraler Mukositis, die als Nebenwirkung der Tumor-Chemotherapie auftritt. Aufgrund der allgemeinen Zellwachstumshemmung durch TGF- β 's können sie zur Unterdrückung von Krebszellen wie beispielsweise Brustkrebszellen verwendet werden.

Die Beteiligung der Hypophysen-Hormone, Aktivine und Inhibine bei der Modulation des weiblichen Menstruationszyklus ist bekannt. Aktivin induziert und Inhibin hemmt die Synthese der Hypophysen-Hormone FSH und LH. Somit wird die Verwendung der erfindungsgemäßen Polypeptidvarianten zur Regulation des weiblichen Menstruationszyklus vorgeschlagen.

Inhibine unterdrücken die Entwicklung von Keimdrüsen-Tumoren. Inhibin-abgeleitete Polypeptidvarianten könnten daher bei der Prophylaxe und zur Behandlung von Keimdrüsen-Tumoren eingesetzt werden.

Aktivine sind vermutlich an der Wundheilung beteiligt. Die Erfindung umfaßt somit die Verwendung von von Aktivin abgeleiteten Polypeptidvarianten zur Herstellung von Medikamenten zur Wundheilung.

Aktivine sind möglicherweise bei der Entwicklung und dem Umsatz von Knorpel zu Knochen beteiligt. Die von Aktivin abgeleiteten Polypeptidvarianten sind somit zur Regulation des Knochen- bzw. Knorpel-Wachstums geeignet.

Aktivin fördert die Expansion von Blast-bildenden Untereinheiten und Kolonie-bildenden Untereinheiten während der Hämatopoese, wohingegen Inhibin diese Funktionen inhibiert. Daher wird die Verwendung von Polypeptidvarianten, die von diesen Proteinen abgeleitet sind, zur Regulation der Hämatopoese vorgeschlagen.

Weitere besonders relevante Polypeptide, die als Grundlage für die Polypeptidvarianten dienen können, sind MIS und GDNF (Glial cell line derived neurotrophic factor), die beide an der Embryonal-Entwicklung beteiligt sind.

In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung ferner eine Matrix zur Osteoinduktion bereit, die mindestens eine Polypeptidvariante und einen Träger umfaßt. Weiterhin wird ein *in vitro*-Verfahren zur Osteoinduktion, in dem die osteoinduktive Matrix verwendet wird, vorgeschlagen.

Im Stand der Technik sind osteoinduktive Matrizen vorgeschlagen worden, die Wachstumsfaktoren enthalten. Beispielsweise befindet sich eine von der Firma Integra Life Sciences Corp. hergestellte Collagen-Matrix, die rekombinantes humanes BMP-2 umfaßt, in der Entwicklung (Hollinger et al., 1998). Weiterhin entwickelt die Firma Sofamor - Danek Titankäfige, die rekombinantes humanes BMP-2 enthalten. Schließlich gibt es eine Vorrichtung unter der Bezeichnung "NOVOSTM" von der Firma Creative Biomolecules, nun als Weiterentwicklung durch die Firma Stryker bekannt, die osteoinduktives Typ I Knochencollagen und rekombinantes OP-1 (BMP-7) enthält. Diese Vorrichtung befindet sich in der klinischen Phase III in den Vereinigten Staaten von Amerika. Die Verwendungen umfassen die Behandlung von orthopädischen Traumata, maxillofaziale Reparaturen und avaskuläre Nekrosen. Weiterhin wird die Verwendung von BMP-7 zur Behandlung von Knorpelschäden, Nierenversagen, Hirn- und Rückenmarksschädigungen, Herzinfarkt und Osteoporose vorgeschlagen.

Typischerweise wird also ein Matrix-Material mit osteoinduktiven Wachstumsfaktoren versetzt und diese Matrix operativ eingesetzt. Die Matrix ist hierbei nicht nur der Träger des Wachstumsfaktors, sondern verleiht auch physikalische Stabilität und verhindert das Eindringen von Weichteilgewebe in den Ort des Knochendefektes. Das Hinzufügen der Wachstumsfaktoren soll hierbei das Ersetzen des Implantates durch neuen Knochen beschleunigen.

Ein Hauptproblem bei den bekannten Matrix-Typen besteht jedoch darin, daß die in der Matrix enthaltenen Proteine sehr rasch den Ort der Anwendung verlassen. Da die Knochenreparatur jedoch ein relativ langsamer Vorgang auch bei Anwesenheit von Wachstumsfaktoren ist, wirkt die kurze Verbleibzeit des hinzugefügten Proteins limitierend.

Da die biologische Wirkung von osteoinduktiven Wachstumsfaktoren darin besteht, die Immigration von pluripotenten mesenchymalen Zellen unter Bildung von Chondro- und Osteovorläuferzellen zu induzieren und deren Aktivität zu stimulieren, erfordert dies die Lokalisierung der Wachstumsfaktoren an der Reparaturstelle. Wachstumsfaktoren, die aus der Reparaturstelle herausdiffundieren, sind einerseits für die beabsichtigte therapeutische Wirkung sinnlos und bergen andererseits die Gefahr einer ektopischen Knochenbildung.

Die erfindungsgemäßen Polypeptidvarianten zeichnen sich im Vergleich mit den bekannten Polypeptiden durch eine erhöhte Heparin-Bindungsfähigkeit aus, die bei Verwendung von Heparin bzw. Heparin-ähnlichen Strukturen als Matrixmaterial oder auf die Matrix aufgebracht Material das rasche Wegdiffundieren der Polypeptidvarianten vom Träger verhindert. Die Polypeptidvarianten bleiben somit am Ort der Wirkung lokalisiert. In einer bevorzugten Ausführungsform besteht der Träger aus Heparin, Hydroxylapatit, Hyaluronsäure, synthetischen Polymeren oder Collagen. Die Trägerstoffe können resorbierbar oder nicht resorbierbar sein.

Im Stand der Technik sind verschiedene Verfahren zum Herstellen von pharmazeutisch verträglichen Matrizen bekannt. Beispiele pharmazeutisch verträglicher Matrizen sind in

Wagner et al., 1996, und Fischgrund et al., 1997 beschrieben. Die Matrix kann in Form eines Blockes, Gels, Vlies, einer Kugel oder Granula ausgebildet sein.

Die Verteilung der Polypeptidvarianten innerhalb der Matrix kann homogen oder nicht-homogen sein, wobei eine homogene Verteilung bevorzugt ist. Die Verteilung der Polypeptidvariante kann, abhängig von der Größe des Defektes oder der Dauer des Heilungsvorgangs, vorteilhaft gestaltet werden. Die Polypeptidvariante sollte hierbei in einer Konzentration von ungefähr $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ bis ungefähr $2 \text{ mg}/\text{cm}^3$, vorzugsweise $250 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ bis $750 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ und besonders bevorzugt $450 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ bis $550 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ Träger liegen. In der Regel wird eine Konzentration von ungefähr $500 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ verwendet werden.

Erfindungsgemäß kann die osteoinduktive Matrix zur Behandlung von orthopädischen Traumata, maxillofaszialen Reparaturen und avaskulären Nekrosen verwendet werden. Weiterhin wird die Verwendung zur Prophylaxe und Therapie von Knorpelschäden, Nierenversagen, Hirn- und Rückenmarksschädigungen, Herzinfarkt und Osteoporose vorgeschlagen.

Die erfindungsgemäße osteoinduktive Matrix weist bei Verwendung rekombinant hergestellter Polypeptidvarianten weiterhin den Vorteil auf, daß sie frei von Kontaminationen, z. B. Viren ist, die bei Wachstumsfaktoren tierischer Herkunft von Zeit zu Zeit beobachtet werden.

Die erfindungsgemäße osteoinduktive Matrix kann *in vitro* verwendet werden, um in Gewebekultur die Ansiedlung von Osteoblasten und/oder Chondroblasten zu ermöglichen. Diese so vorbereiteten osteoinduktiven Matrizen können sodann autolog oder heterolog mit chirurgischen Verfahren in Patienten eingebracht werden (Kübler et al., 1997; Kübler et al., 1998; Chen et al., 1998).

Es ist beabsichtigt, mit den nachfolgenden Figuren und Beispielen die Erfindung zu erläutern, diese jedoch in keiner Weise einzuschränken. Dem Fachmann sind aufgrund der Beschreibung und der Beispiele weitere Ausführungsformen zugänglich, die ebenfalls umfaßt sind.

Beschreibung der Figuren:

Fig. 1 zeigt Abbildungen einiger Strukturformeln von typischen Disaccharideinheiten Heparin-ähnlicher Strukturen, wie sie unter anderem in bestimmten Glykosaminoglykanen auftreten.

Fig. 2 zeigt das Bild eines mit Coomassie Blau angefärbten SDS-Polyacrylamidgels nach Auftrennung der in *E. coli* exprimierten und gereinigten Varianten T3 und T4 sowie von BMP-2 und EHBMP-2 in oxidiert (oben) und reduzierter (unten) Form. Links ist jeweils ein Molekulargewichtsstandard (15, 20, 30, 35, 68 und 94 kD) aufgetragen. Die Gele wurden (von links nach rechts) wie folgt beladen: Spuren 1-4: je 2 µg BMP-2, EHBMP-2, T3 (SEQ ID No: 5) und T4 (SEQ ID No: 6); Spuren 5-8: je 5 µg BMP-2, EHBMP-2, T3, T4.

Fig. 3 zeigt eine graphische Darstellung von mit dem Pharmacia BIA2000 System aufgenommenen Sensogrammen der Bindung der Varianten T3 und T4 (SEQ ID No: 5 und 6) sowie von BMP-2 an Heparin.

Fig. 4 zeigt eine graphische Darstellung von mit dem BIA2000 System aufgenommenen Sensogrammen der Bindung der Varianten T3 und T4 (SEQ ID No: 5 und 6) sowie von BMP-2 an die Ektodomäne des Rezeptors BMPR-IA.

Fig. 5 zeigt in einer graphischen Darstellung den Einbau von $^{35}\text{SO}_4$ in kultivierte Zellen aus Gliedmaßenknospen von Hühnerembryonen in Abhängigkeit von der Konzentration von BMP-2, der Variante T3 und der Variante T4 (SEQ ID No. 5 und 6).

Fig. 6 zeigt in einer graphischen Darstellung die Induktion der Alkalischen Phosphatase in kultivierten C2C12 Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration von BMP-2, der Variante T3 und der Variante T4 (SEQ ID No. 5 und 6).

Fig. 7a und 7b zeigen histologische Ansichten von in der Maus gebildeten Ossikeln, die durch Implantation von BMP-2 induziert wurden. Die Präparate wurden mit Hematoxylin-Eosin gefärbt. Ossikel erscheinen violett, mit darin eingeschlossenen weissen oder dunkelvioletten Arealen. Bei den dunkelvioletten Bereichen handelt es sich um Knochenmark, bei den weissen Zellen um Fettgewebe, das natürlicherweise im Knochenmark vorkommt. Die umgebende Muskulatur ist intensiv rot gefärbt.

Fig. 8 zeigt die histologische Ansicht eines in der Maus gebildeten Ossikels, das durch Behandlung mit T3 induziert wurde. Das Präparat wurde ebenfalls mit Hematoxylin-Eosin gefärbt.

Fig. 9 zeigt eine Röntgenaufnahme eines durch T3-Implantation in der Maus gebildeten Ossikels.

Fig. 10 zeigt die histologische Ansicht eines in der Maus gebildeten Ossikels, das durch Behandlung mit T3 induziert wurde.

Methoden

Messung der Heparin-Bindung

Zur Messung der Heparin-Bindung wurde Heparin 6000 aminobiotinyliert (Mach et al., 1993) und an einen Streptavidin-beschichteten Biosensor CM5 (Pharmacia Biosensor AB) fixiert. Die Bindung von Polypeptiden und erfindungsgemäßen Polypeptidvarianten mit erhöhter Heparin-Bindungsfähigkeit an den Heparin-dotierten Biosensor wurde mit Hilfe eines BIA2000 Gerätes gemessen. Die einzelnen Versuchsbedingungen sind vorbeschrieben (Ruppert et al., 1996).

Messung der Bindung an den Rezeptor BMPR-IA

Zur Messung der Bindung wurde die Ektodomäne des Rezeptors BMPR-IA aminobiotinyliert (Shen et al., 1996) und an einen Streptavidin-beschichteten Biosensor CM5

(Pharmacia Biosensor AB) fixiert. Die Bindung von Polypeptiden und den erfindungsgemäßen Polypeptidvarianten an den Rezeptor-dotierten Biosensor wurde mit Hilfe eines BIA2000 Gerätes gemessen.

Messung der biologischen Osteoinduktions-Aktivität

Zur Messung der biologischen Aktivität wurde folgendes Zellkultursystem verwendet: Zellen aus den Gliedmaßenknospen von Hühnerembryonen wurden isoliert und für die Messung des BMP-abhängigen Einbaus von $^{35}\text{SO}_4$ in Proteoglykane verwendet (Ruppert et al., 1996). Es wurde ein Konzentrationsbereich für das BMP-Protein gewählt, der es ermöglichte, sowohl die maximale Zellantwort als auch die EC_{50} -Konzentration (Konzentration, bei der 50 % des maximalen Einbaus erreicht werden) zu bestimmen.

Die myoblastäre Maus-Zelllinie C2C12 wurde verwendet, um die BMP-abhängige Induktion der Alkalischen Phosphatase zu bestimmen (Katagiri et al., 1994). Es konnten die maximale Zellantwort und die EC_{50} -Konzentration bestimmt werden.

Beispiel 1: Expression und Charakterisierung von T3

Es wurde cDNA (Ruppert et al., 1996), die für das reife humane BMP-2 (NIH-Datenbank Entrez/Swiss-Prot Nr. P12643) und zusätzlich ATGGCT (Met-Ala) am 5' Ende kodierte, einer Kassetten-Mutagenese (Wang et al., 1997) unterworfen. Zwischen die singulären Spaltstellen für *NcoI* und *AflII* wurde folgende doppelsträngige DNA eingefügt:

```
5' CATGGCTCAAGCCAAACACAAACAGCGGAAACGCGCTCGTAAACGTC 3' SEQ ID NO: 9
3'      CGAGTTCGGTTTGTGTTTGTGCGCCTTTGCGCGAGCATTTGCAGAATT 5' SEQ ID NO: 10
```

Dadurch wurde zwischen Gln an Position 8 und Arg an Position 9 eines humanen Met-Ala-BMP-2 zusätzlich die Sequenz Arg-Lys-Arg-Ala (SEQ ID No. 3) eingefügt. Die mutierte cDNA wurde als *NcoI/BamHI*-Fragment in den Expressionsvektor pRBSIIp_{N25X/o} (Stueber et al., 1984) integriert, und die Mutation durch Sequenzierung bestätigt.

Nach Expression und Isolierung zeigte sich, daß die so hergestellte Variante T3 in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ein im Vergleich zu BMP-2 erwartungsgemäß höheres apparentes Molekulargewicht aufwies. T3 interagierte in Biosensor Experimenten (BIA2000) mit unveränderter Affinität (Dissoziationskonstante K_d : ca. 200 pM) mit der Ektodomäne des BMP-Rezeptors BMPR-IA (NIH-Datenbank Entrez/Swiss-Prot Nr. P36894). Die Bindung an Heparin war jedoch im Vergleich zu BMP-2 erhöht, wohingegen die Abdissoziierung verlangsamt war.

Die biologische Aktivität war in verschiedenen Testsystemen verändert. Die über einen Sulfateinbau gemessene Proteoglykansynthese in Zellen der Gliedmaßenknospen von Hühnerembryonen zeigte einen höheren EC_{50} -Wert für T3 im Vergleich zu BMP-2. Der maximal erreichbare Einbau war unverändert. Die Induktion der Alkalischen Phosphatase-Aktivität in der C2C12-Zelllinie zeigte für T3 ebenfalls einen höheren EC_{50} -Wert als für BMP-2.

Beispiel 2: Expression und Charakterisierung von T4

Es wurde Beispiel 1 mit der Ausnahme wiederholt, daß folgende doppelsträngige DNA in die BMP-2 cDNA integriert wurde:

```
5' CATGGCTCAAGCCAAACACAAACAGCGGAAACGCGCTAAGCATAAGCAACGTAAGCGTC 3'
3'   CGAGTTCGGTTTGTGTTTGTGCGCCTTTGCGCGATTTCGTATTCGTTGCATTGCGAGAATT 5'
```

Die obere Sequenz wird mit SEQ ID NO: 11, die untere mit SEQ ID NO: 12 im Sequenzprotokoll angegeben.

Dadurch wurde zwischen Gln an Position 8 und Arg an Position 9 des BMP-2 zusätzlich die Sequenz Arg-Lys-Arg-Ala-Lys-His-Lys-Gln eingefügt.

Die so exprimierte und isolierte Variante T4 wies in der SDS-PAGE ein höheres apparentes Molekulargewicht als T3 und BMP-2 auf. T4 bindet an die Ektodomäne des BMP-

Rezeptors BMPR-IA mit einer Dissoziationskonstante von etwa 340 pM. Dies entspricht der Rezeptor-Affinität von BMP-2 (K_d 320 pM). Die Bindung von T4 an Heparin war jedoch im Vergleich zu BMP-2 erhöht, und die Abdissoziation verlangsamt. Die Freisetzung von T4 von Heparin war überraschenderweise langsamer als die von T3.

Die biologische Aktivität von T4 ist im Vergleich zu BMP-2 verändert. T4 zeigt während der Proteoglykansynthese (Sulfateinbau) in Zellen von Gliedmaßenknospen von Hühnerembryonen einen höheren EC_{50} -Wert als BMP-2 (und sogar höher als T3). Ebenso wird die Aktivität der Alkalischen Phosphatase in C2C12-Zellen durch T4 bei einem höheren EC_{50} -Wert induziert als durch BMP-2.

Beispiel 3: Untersuchungen zur *in vivo*-Wirksamkeit der Polypeptidvarianten

Als Methode wurde hierbei die Induktion von ektotopem Knochen im Oberschenkelmuskel der Maus gewählt. Bei ektoper Knochenbildung entsteht Knochen *de novo* in einem fremden Gewebe und ohne Kontakt zum Skelettsystem. Der Vorteil dieses Testsystems liegt in seiner hohen Stringenz. Da kein Kontakt mit skelettalem Knochen existiert, spielen regenerative Knochenheilungsprozesse keine Rolle. Somit werden falsch positive Versuchsergebnisse vermieden, die durch Verletzung des Knochens während der Operation verursacht werden könnten.

Die Methode zur Induktion ektoper Knochenbildung in ICR-Mäusen ist im Detail beschrieben in Kübler und Urist, 1991.

BMP-2 und die Variante T3 wurden in unterschiedlichen Konzentrationen mit Rinderserumalbumin als Träger vermischt, und in den Musculus quadriceps femoris von ICR-Mäusen implantiert. Nach 3 Wochen wurde das gebildete Knochenmaterial durch Röntgenaufnahmen und histologische Untersuchungen charakterisiert.

Die Implantation von Rinderserumalbumin ohne BMP (Kontrolle) ergab in keinem Fall nachweisbare Knochenbildung. Weder mit BMP-2 noch mit T3 wurden Anzeichen für eine Entzündung oder sonstige schädliche Nebenwirkungen beobachtet. Fig. 7 ist zu

entnehmen, daß BMP-2 die Bildung von Knochenmatrix und Knochenmark induzieren konnte. Fig. 8 zeigt die entsprechende Abbildung für die Behandlung mit T3. Im Vergleich zum Ergebnis mit BMP-2 zeigt sich für T3, daß das Verhältnis von Knochenmatrix zu Knochenmark stark in Richtung eines hohen Anteils von Knochenmatrix verschoben ist.

Fig. 9 zeigt eine Röntgenaufnahme eines durch T3 Implantation gebildeten Ossikels. Die Größe des Ossikels unterscheidet sich nicht wesentlich von Ossikeln, die im gleichen Testsystem mit konventionellen BMPs erhalten wurden.

Fig. 10 zeigt die histologische Ansicht eines Ossikels, das durch Behandlung mit T3 induziert wurde. Die Färbung wurde hier mit Masson-Trichrome durchgeführt, was es erlaubt, den Differenzierungsstatus von Knochengewebe zu unterscheiden. Rote Farbe zeigt komplett ausdifferenzierten Knochen an, türkise Areale sind noch im Prozess der Ossifikation begriffen. Zum Teil können in dem türkis gefärbten Gewebe runde, weisse Zellen ausgemacht werden; es handelt sich dabei um Restanteile von knorpelbildenden Chondrocyten, da die BMP-induzierte Knochenbildung durch endochondrale Ossifikation erfolgt (transiente Knorpelbildung).

Die den Figuren 7 bis 10 zugrundeliegenden Versuche werden mit jeweils 10 µg rekombinantem humanem BMP-2 bzw. rekombinanten T3 (SEQ ID No. 5) durchgeführt. In der folgenden Tabelle wird die *in vivo* Wirksamkeit von BMP-2 und rekombinantem T3 verglichen.

rhBMP-2 (μg)	T3 (μg)	Knochenbildung
-	-	0/30
0,4	-	0/3
-	0,4	3/4
1	-	0/9
-	1	4/4
4	-	3/3
-	4	4/4
10	-	10/11
-	10	4/4

Tabelle 1: Vergleich der durch BMP-2 bzw. T3-induzierten Knochenbildung.

Es zeigt sich, daß T3 bei geringen Konzentrationen wirksamer ist als BMP-2 (Tabelle 1). Bei Implantation von 1 μg BMP-2 erfolgte in keinem von neun Versuchen Knochenbildung, wohingegen bei der gleichen Menge T3 in vier von vier implantierten Tieren Knochen gebildet wurde. T3 induziert sogar bei Applikation von nur 0,4 μg noch in 3 von 4 Tieren Knochenbildung.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Polypeptidvariante mit erhöhter Heparin-Bindungsfähigkeit *in vivo* die Knochenbildung induzieren kann. Es wurden in keinem Fall Entzündungsreaktionen oder sonstige Unverträglichkeiten beobachtet. Im Vergleich zu konventionellem BMP-2 bewirkt die Anwendung von T3 die Bildung eines Ossikels mit wesentlich höherem Anteil an Knochenmatrix. Da die Matrix dem Knochen seine mechanische Stabilität verleiht, wird ein in diesem Sinne dichter Knochen eine wesentlich höhere Festigkeit und funktionelle Belastbarkeit aufweisen. Es wird also im Vergleich zu BMP-2 die Bildung eines Knochens mit deutlich höherer Qualität induziert. Da T3 bei einer geringeren Konzentration als BMP-2 *in vivo* biologische Wirksamkeit zeigt, kann auch die erforderliche Menge an Wachstumsfaktor reduziert werden. Dies stellt einen wünschenswerten Vorteil der Polypeptidvariante im Vergleich zu BMP-2 dar.

Literaturliste

- Altschul et al., J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410
- Altschul et al., BLAST Handbuch, NCB NLM NIH Bethesda MD 20894
- Chen et al., Neurosurg. Focus 4 (1998), Artikel 11
- Devereux et al., Nucleic Acid Res. 12 (1984), 387
- Fischgrund et al., J. Spinal Disorder 10 (1997), 467-472
- Henikoff & Henikoff, PNAS USA 89 (1992), 10915-10919
- Hollinger et al., J. Biomed. Mater. Res. 43 (1998), 356-364
- Katagiri et al., J. Cell. Biol. 127 (1994), 1755-66; Erratum publiziert in J. Cell. Biol. 128 (1995), 714
- Kingsley, Genes Dev. 8 (1994), 133-146
- Kübler et al., Dtsch. Zahnärztl. Z. 53 (1998), 834-843
- Kübler et al., Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie 1 (1997), 2-25
- Kübler et al., Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie 3 (Suppl. 1) (1999), 134-139
- Kübler & Urist, J. Craniomaxillofac. Surg. 19 (1991), 283-288
- Mach et al., Biochemistry 32, (1993), 5480-89
- Maniatis et al., Molecular Cloning (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press
- McDonald & Hendrickson, Cell 73 (1993), 421-24
- Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48 (1970), 443-453
- Recombinant Gene Expression Protocols, Hrsg. R. S. Tuan Methods in Molecular Biology 62 (1995), Humana Press, Totowa, New Jersey
- Reddi, Nature Biotechnol. 16 (1998), 247-52
- Ruppert et al., Eur. J. Biochem. 237 (1996), 295-302
- Shen et al., Eur. J. Biochem. 240 (1996), 252-261
- Stueber et al., EMBO J. 3 (1984), 3143-3148
- Wagner et al., J. Surg. Res. 66 (1996), 100-108
- Wang et al., PNAS 94 (1997), 1657-62
- Weigel et al., Eur. J. Biochem. 180 (1989), 295-300

Patentansprüche

1. Polypeptidvariante mit erhöhter Heparin-Bindungsfähigkeit, **dadurch gekennzeichnet**, daß
- (i) an die Aminosäuresequenz eines Polypeptides wenigstens ein Oligopeptid, umfassend die Aminosäuresequenz $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$, addiert ist; und/oder
 - (ii) in die Aminosäuresequenz eines Polypeptides wenigstens ein Oligopeptid, umfassend die Aminosäuresequenz $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$, inseriert ist; und/oder
 - (iii) wenigstens eine natürlicherweise in der Aminosäuresequenz eines Polypeptids vorkommende Oligopeptidsequenz durch ein Oligopeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$, substituiert ist,

wobei

X_1 =K, R oder H;
 X_2 =K, R oder H;
 X_3 =K, R, H oder keine Aminosäure;
 X_4 =kein K, R, H, sonst beliebige Aminosäure;
 X_5 =kein K, R, H, sonst beliebige oder keine Aminosäure;
 X_6 =kein K, R, H, sonst beliebige oder keine Aminosäure (SEQ ID NO:1)

oder

X_1 =K, R oder H;
 X_2 =kein K, R, H, sonst beliebige Aminosäure;
 X_3 =K, R oder H;
 X_4 =kein K, R, H, sonst beliebige Aminosäure;
 X_5 =kein K, R, H, sonst beliebige oder keine Aminosäure;
 X_6 =kein K, R, H, sonst beliebige oder keine Aminosäure (SEQ ID NO:2)

bedeutet.

2. Polypeptidvariante gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein bis vier Kopien des Oligopeptides an ein bis vier Positionen in das Polypeptid eingefügt sind.
3. Polypeptidvariante gemäß Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Oligopeptid die Aminosäuresequenz RKRA (SEQ ID NO:3) oder RKRAKHKQ (SEQ ID NO:4) umfaßt.
4. Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Oligopeptid an den N-Terminus addiert ist und/oder in den N-terminalen Bereich inseriert ist und/oder einen Teil des N-terminalen Bereiches substituiert.
5. Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Aminosäuresequenz der Polypeptidvariante ferner eine für die rekombinante Expression relevante Sequenz am N-Terminus umfaßt, wobei die für die rekombinante Expression relevante Sequenz M oder MZ ist und wobei M Methionin und Z eine oder mehrere beliebige Aminosäuren bedeutet.
6. Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Polypeptidvariante ferner ein His-Tag umfaßt.
7. Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Polypeptid biologische Aktivität aufweist.
8. Polypeptidvariante gemäß Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Polypeptid osteogenetische Aktivität aufweist.
9. Polypeptidvariante gemäß Anspruch 7 oder 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Polypeptid ausgewählt ist aus einem Hormon, einem Cytokin oder einem Wachstumsfaktor, oder einem Hormon, einem Cytokin, einem Wachstumsfaktor, das durch Addition, Substitution, Insertion, Inversion und/oder Deletion verändert ist, wobei das durch Addition, Substitution, Insertion, Inversion und/oder Deletion veränderte Polypeptid wenigstens 10 % der biologischen Aktivität des unveränderten Polypeptides aufweist und/oder mindestens 50 % homolog dazu ist.

10. Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 7 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Polypeptid aus Mitgliedern der DVR-Familie einschließlich der TGF- β Superfamilie ausgewählt ist.
11. Polypeptidvariante gemäß Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Polypeptid BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7/OP-1 oder BMP-8/OP-2 ist.
12. Polypeptidvariante gemäß Anspruch 10 oder 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Oligopeptid vor dem Cystinknoten eingefügt ist.
13. Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Polypeptidvariante die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 5 (T3) oder SEQ ID NO:6 (T4) hat.
14. Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Polypeptidvariante ein Poly-, Oligo- oder Dimer der Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13 ist.
15. Nukleinsäuremolekül, umfassend eine für eine Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 kodierende Nukleinsäuresequenz.
16. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Nukleinsäuresequenz von einer genomischen DNA oder cDNA abgeleitet oder eine synthetische DNA ist.
17. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 15 oder 16, weiterhin umfassend einen zur Expressionskontrolle geeigneten Promotor, wobei die für eine Polypeptidvariante kodierende Nukleinsäuresequenz unter der Kontrolle des Promotors steht.
18. Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 15 bis 17, wobei das Nukleinsäuremolekül wenigstens einen Teil eines Vektors enthält.

19. Wirtszelle, enthaltend ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 15 bis 18, wobei die Wirtszelle eine zur Expression des Nukleinsäuremoleküls geeignete prokaryontische oder eukaryontische Zelle ist.
20. Verfahren zum Herstellen einer Polypeptidvariante mit erhöhter Heparin-Bindungsfähigkeit gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14, umfassend
das Addieren wenigstens eines Oligopeptides, das eine Aminosäuresequenz enthält, die ausgewählt aus: SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:2, an die Aminosäuresequenz eines Polypeptides; und/oder
das Inserieren wenigstens eines Oligopeptides, das eine Aminosäuresequenz enthält, die ausgewählt aus: SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:2, in die Aminosäuresequenz eines Polypeptides; und/oder
das Substituieren wenigstens einer natürlicherweise in der Aminosäuresequenz eines Polypeptids vorkommenden Oligopeptidsequenz durch ein Oligopeptid, das eine Aminosäuresequenz enthält, die ausgewählt ist aus: SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:2.
21. Verfahren gemäß Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Verfahren ein chemisches und/oder enzymatisches Syntheseverfahren umfaßt.
22. Verfahren gemäß Anspruch 20 oder 21, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Verfahren gentechnologische Verfahren umfaßt.
23. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 20 bis 22, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Verfahren umfaßt:
- a) *in vitro* Mutagenese einer für ein Polypeptid kodierenden Nukleinsäure, so daß (i) an die für das Polypeptid kodierende Nukleinsäure wenigstens eine Nukleinsäure addiert wird, die für ein Oligopeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz, ausgewählt aus SEQ ID Nos. 1 und 2, enthält; und/oder (ii) in die für das Polypeptid kodierende Nukleinsäure wenigstens eine Nukleinsäure inseriert wird, die für ein Oligopeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz, ausgewählt aus SEQ ID Nos. 1 und 2, enthält; und/oder (iii) wenigstens eine natürlicherweise in der für das Polypeptid kodierenden Nukleinsäure vorkommende Nukleinsäuresequenz durch eine Nukleinsäuresequenz substituiert wird,

die für ein Oligopeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz, ausgewählt aus: SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:2, enthält;

- b) Einklonieren der mutierten Nukleinsäure in einen geeigneten Expressionsvektor;
- c) Transformieren/Transfizieren einer geeigneten Wirtszelle mit dem erhaltenen Expressionsvektor;
- d) Kultivieren der transformierten/transfizierten Wirtszelle unter zur Expression geeigneten Bedingungen;
- e) Isolieren und gegebenenfalls Renaturieren der exprimierten Polypeptidvariante.

24. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 20 bis 23, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Verfahren in einer prokaryontischen Wirtszelle, vorzugsweise *E. coli*, durchgeführt wird.

25. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 20 bis 23, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Verfahren in einer eukaryontischen Zelle, bevorzugt einer Hefe-, Pflanzen-, Insekten-, CHO- oder COS-Zelle, durchgeführt wird.

26. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 und gegebenenfalls physiologisch verträgliche Zusatzstoffe.

27. Verwendung einer Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Stimulierung der Osteogenese oder Wundheilung, oder zur Behandlung von Entzündung oder Krebs.

28. Zusammensetzung zur Osteoinduktion, umfassend eine Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 und einen Träger, ausgewählt aus Heparin, Hydroxylapatit, Hyaluronsäure, synthetischen Polymeren und Collagen.

29. Osteoinduktive Matrix, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie Heparin oder Heparin-ähnliche Substanzen enthält oder damit beschichtet ist und an das Heparin oder die Heparin-ähnlichen Substanzen Polypeptidvarianten gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 adsorbiert sind.

GEÄNDERTE ANSPRÜCHE

[beim International Büro am 30.Juni 2000 (30.06.00) eingegangen ;
ursprüngliche Ansprüche 1-29 durch neue Ansprüche 1-26 ersetzt (5 Seiten)]

Patentansprüche

1. Polypeptidvariante mit erhöhter Heparin-Bindungsfähigkeit, **dadurch gekennzeichnet**, daß
 - (i) an die Aminosäuresequenz eines Polypeptides wenigstens ein Oligopeptid, umfassend die Aminosäuresequenz $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$, addiert ist;
und/oder
 - (ii) in die Aminosäuresequenz eines Polypeptides wenigstens ein Oligopeptid, umfassend die Aminosäuresequenz $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$, inseriert ist,
und/oder
 - (iii) wenigstens eine natürlicherweise in der Aminosäuresequenz eines Polypeptids vorkommende Oligopeptidsequenz durch ein Oligopeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$, substituiert ist,

wobei

X_1 =K, R oder H;
 X_2 =K, R oder H;
 X_3 =K, R, H oder keine Aminosäure;
 X_4 =kein K, R, H, sonst beliebige Aminosäure;
 X_5 =kein K, R, H, sonst beliebige oder keine Aminosäure;
 X_6 =kein K, R, H, sonst beliebige oder keine Aminosäure (SEQ ID NO:1)

oder

X_1 =K, R oder H;
 X_2 =kein K, R, H, sonst beliebige Aminosäure;
 X_3 =K, R oder H;
 X_4 =kein K, R, H, sonst beliebige Aminosäure;
 X_5 =kein K, R, H, sonst beliebige oder keine Aminosäure;
 X_6 =kein K, R, H, sonst beliebige oder keine Aminosäure (SEQ ID NO:2)

bedeutet und

das Polypeptid aus Mitgliedern der DVR-Familie einschließlich der TGF- β Superfamilie ausgewählt ist.

2. Polypeptidvariante gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein bis vier Kopien des Oligopeptides an ein bis vier Positionen in das Polypeptid eingefügt sind.
3. Polypeptidvariante gemäß Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Oligopeptid die Aminosäuresequenz RKRA (SEQ ID NO:3) oder RKRAKHKQ (SEQ ID NO:4) umfaßt.
4. Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Oligopeptid an den N-Terminus addiert ist und/oder in den N-terminalen Bereich inseriert ist und/oder einen Teil des N-terminalen Bereiches substituiert.
5. Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Aminosäuresequenz der Polypeptidvariante ferner eine für die rekombinante Expression relevante Sequenz am N-Terminus umfaßt, wobei die für die rekombinante Expression relevante Sequenz M oder MZ ist und wobei M Methionin und Z eine oder mehrere beliebige Aminosäuren bedeutet.
6. Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Polypeptidvariante ferner ein His-Tag umfaßt.
7. Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Polypeptid durch Addition, Substitution, Insertion, Inversion und/oder Deletion verändert ist, wobei das durch Addition, Substitution, Insertion, Inversion und/oder Deletion veränderte Polypeptid wenigstens 10 % der biologischen Aktivität des unveränderten Polypeptides aufweist und/oder mindestens 50 % homolog dazu ist.
8. Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 - 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Polypeptid BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7/OP-1 oder BMP-8/OP-2 ist.
9. Polypeptidvariante einem der Ansprüche 1 - 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Oligopeptid vor dem Cystinknoten eingefügt ist.

10. Polypeptidvariante gemäß Anspruch 8 oder 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Polypeptidvariante die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 5 (T3) oder SEQ ID NO:6 (T4) hat.
11. Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Polypeptidvariante ein Poly-, Oligo- oder Dimer der Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 ist.
12. Nukleinsäuremolekül, umfassend eine für eine Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 kodierende Nukleinsäuresequenz.
13. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Nukleinsäuresequenz von einer genomischen DNA oder cDNA abgeleitet oder eine synthetische DNA ist.
14. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 12 oder 13, weiterhin umfassend einen zur Expressionskontrolle geeigneten Promotor, wobei die für eine Polypeptidvariante kodierende Nukleinsäuresequenz unter der Kontrolle des Promotors steht.
15. Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14, wobei das Nukleinsäuremolekül wenigstens einen Teil eines Vektors enthält.
16. Wirtszelle, enthaltend ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 12 bis 15, wobei die Wirtszelle eine zur Expression des Nukleinsäuremoleküls geeignete prokaryontische oder eukaryontische Zelle ist.
17. Verfahren zum Herstellen einer Polypeptidvariante mit erhöhter Heparin-Bindungsfähigkeit gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, umfassend das Addieren wenigstens eines Oligopeptides, das eine Aminosäuresequenz enthält, die ausgewählt aus: SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:2, an die Aminosäuresequenz eines Polypeptides; und/oder das Inserieren wenigstens eines Oligopeptides, das eine Aminosäuresequenz enthält, die ausgewählt aus: SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:2, in die Aminosäuresequenz eines Polypeptides; und/oder das Substituieren wenigstens einer natürlicherweise in der Aminosäuresequenz eines

Polypeptids vorkommenden Oligopeptidsequenz durch ein Oligopeptid, das eine Aminosäuresequenz enthält, die ausgewählt ist aus: SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:2.

18. Verfahren gemäß Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Verfahren ein chemisches und/oder enzymatisches Syntheseverfahren umfaßt.
19. Verfahren gemäß Anspruch 17 oder 18, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Verfahren gentechnologische Verfahren umfaßt.
20. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 17 bis 19, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Verfahren umfaßt:
 - a) *in vitro* Mutagenese einer für ein Polypeptid kodierenden Nukleinsäure, so daß (i) an die für das Polypeptid kodierende Nukleinsäure wenigstens eine Nukleinsäure addiert wird, die für ein Oligopeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz, ausgewählt aus SEQ ID Nos. 1 und 2, enthält; und/oder (ii) in die für das Polypeptid kodierende Nukleinsäure wenigstens eine Nukleinsäure inseriert wird, die für ein Oligopeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz, ausgewählt aus SEQ ID Nos. 1 und 2, enthält; und/oder (iii) wenigstens eine natürlicherweise in der für das Polypeptid kodierenden Nukleinsäure vorkommende Nukleinsäuresequenz durch eine Nukleinsäuresequenz substituiert wird, die für ein Oligopeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz, ausgewählt aus: SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:2, enthält;
 - b) Einklonieren der mutierten Nukleinsäure in einen geeigneten Expressionsvektor;
 - c) Transformieren/Transfizieren einer geeigneten Wirtszelle mit dem erhaltenen Expressionsvektor;
 - d) Kultivieren der transformierten/transfizierten Wirtszelle unter zur Expression geeigneten Bedingungen;
 - e) Isolieren und gegebenenfalls Renaturieren der exprimierten Polypeptidvariante.
21. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 17 bis 20, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Verfahren in einer prokaryontischen Wirtszelle, vorzugsweise *E. coli*, durchgeführt wird.
22. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 17 bis 20, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Verfahren in einer eukaryontischen Zelle, bevorzugt einer Hefe-, Pflanzen-, In-

sekten-, CHO- oder COS-Zelle, durchgeführt wird.

23. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 und gegebenenfalls physiologisch verträgliche Zusatzstoffe.
24. Verwendung einer Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 zur Stimulierung der Osteogenese oder Wundheilung, oder zur Behandlung von Entzündung oder Krebs.
25. Zusammensetzung zur Osteoinduktion, umfassend eine Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 und einen Träger, ausgewählt aus Heparin, Hydroxylapatit, Hyaluronsäure, synthetischen Polymeren und Collagen.
26. Osteoinduktive Matrix, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie Heparin oder Heparin-ähnliche Substanzen enthält oder damit beschichtet ist und an das Heparin oder die Heparin-ähnlichen Substanzen Polypeptidvarianten gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 adsorbiert sind.

Erklärung nach Artik I 19 (1) PCT

In Feld I.2 des Internationalen Recherchenberichtes beanstandet der Prüfer, dass sich die ursprünglichen Patentansprüche 1, 2, 4 – 12 und 14 – 29 auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Polypeptide beziehen und dass daher eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich nicht möglich erscheint.

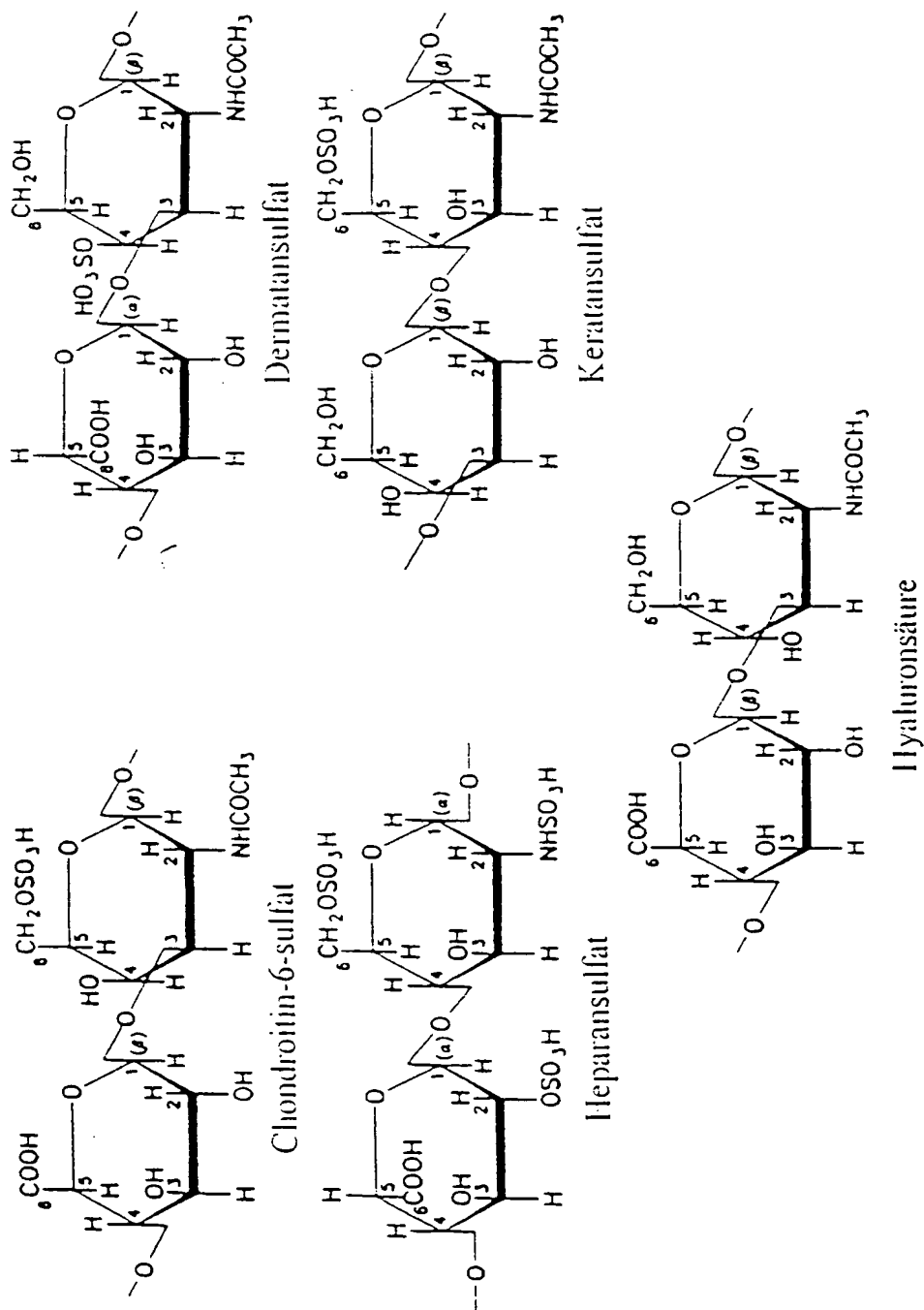
Der neue Anspruch 1 wurde durch Aufnahme des Merkmals aus dem ursprünglichen Anspruch 10 präzisiert. Die Präzisierung wurde eingeführt, um eine sinnvolle Recherche und Prüfung zu erleichtern.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Erkenntnis zugrunde, dass durch das Addieren und/oder Inserieren eines Oligopeptides in die Aminosäuresequenz eines Polypeptides und/oder das Substituieren einer natürlicherweise in der Aminosäuresequenz eines Polypeptides vorkommenden Oligopeptidsequenz durch ein Oligopeptid mit zwei positiv geladenen Aminosäuren, die benachbart oder durch eine Aminosäure voneinander getrennt vorkommen, bzw. 3 positiv geladenen Aminosäuren, die Heparinbindungsfähigkeit der Polypeptidvariante im Verhältnis zum Ausgangspolypeptid erhöht wird. Der positiv geladene Kern ist hierbei C-terminal einer nicht-positiv geladenen Aminosäure benachbart.

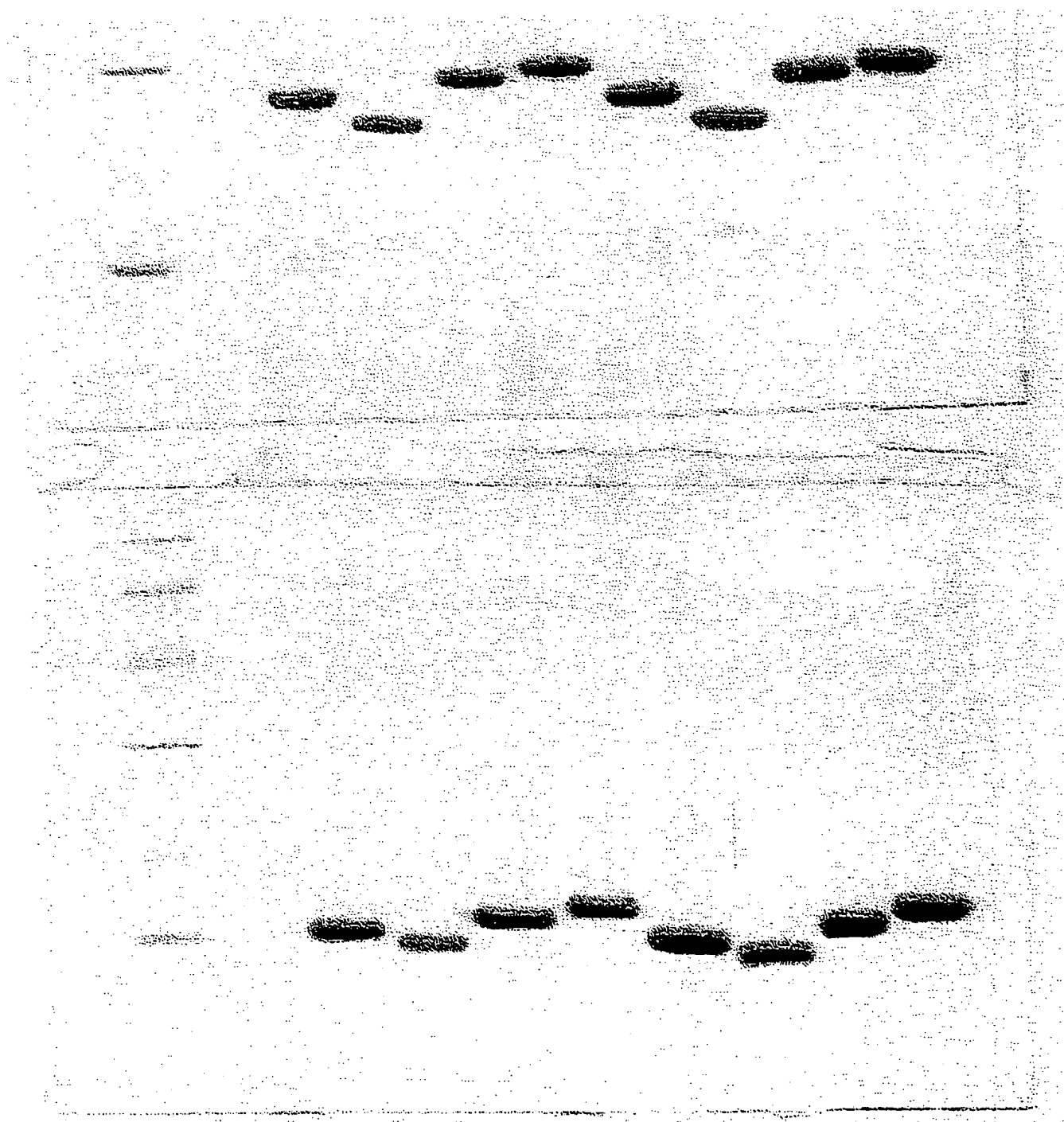
Die in Anspruch 1 angegebene generische Formel reflektiert die vorstehend genannte Erkenntnis, um dem Anmelder einen sinnvollen Schutz für die geleistete Erfindung zu gewähren. Für Recherche- und Prüfungszwecke wird darauf hingewiesen, dass der Kern der Erfindung, d. h. das Hinzufügen oder Ersetzen von 2 bzw. 3 positiv geladenen Aminosäuren in einem Polypeptid aus der DVR-Familie ohne unzumutbaren Aufwand recherchierbar ist, da die Zahl der Kombinationen aus 2 oder 3 positiv geladenen Aminosäuren Arginin, Lysin und Histidin 9 (3 x 3) bzw. 27 (3 x 3 x 3) Möglichkeiten ergibt.

Die Ausführungsbeispiele, in denen die Oligopeptide RKRA bzw. RKRAKHKQ eingeführt wurden, stützen die Breite des Anspruchs, da vernünftigerweise anzunehmen ist, dass homologe Substitutionen dieser Oligopeptide wie z. B. KKKA bzw. RRRA ebenfalls zu einer erhöhten Heparin-Bindungsfähigkeit der erhaltenen Polypeptidvariante beitragen.

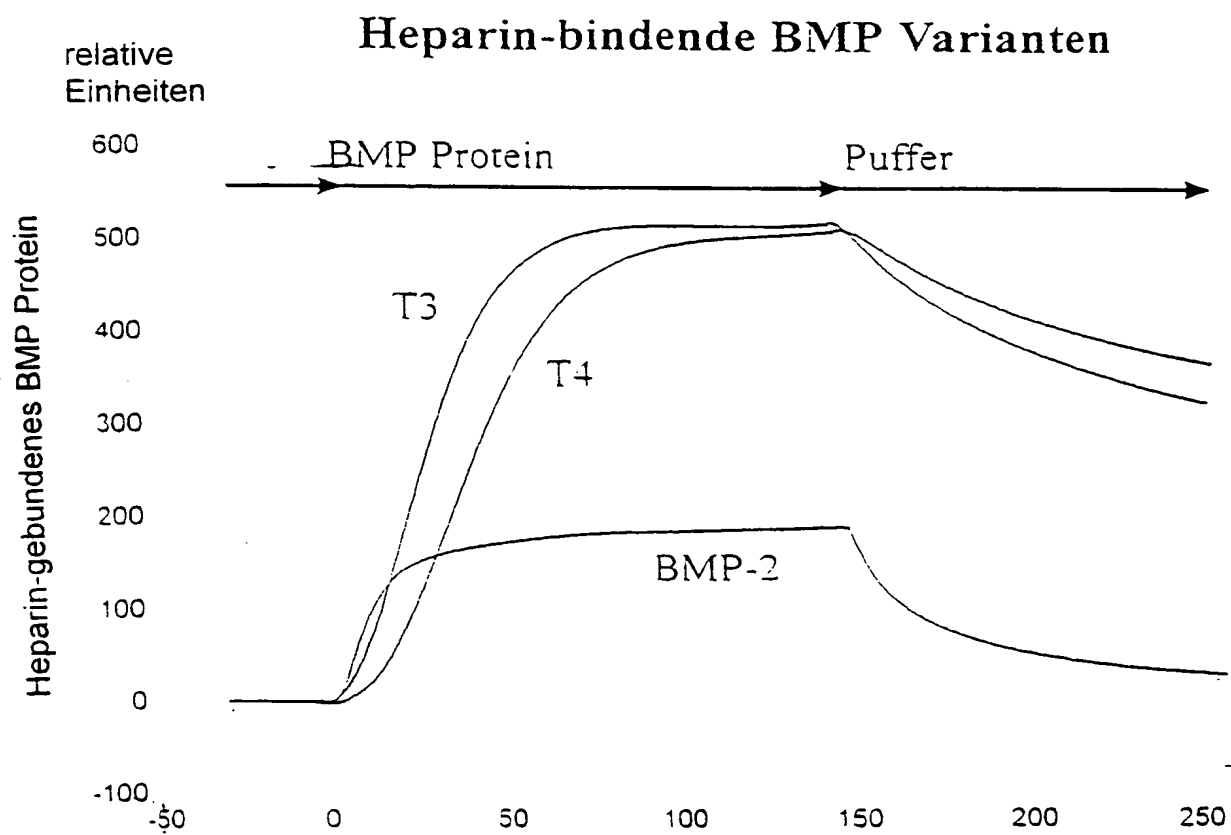
Figur 1

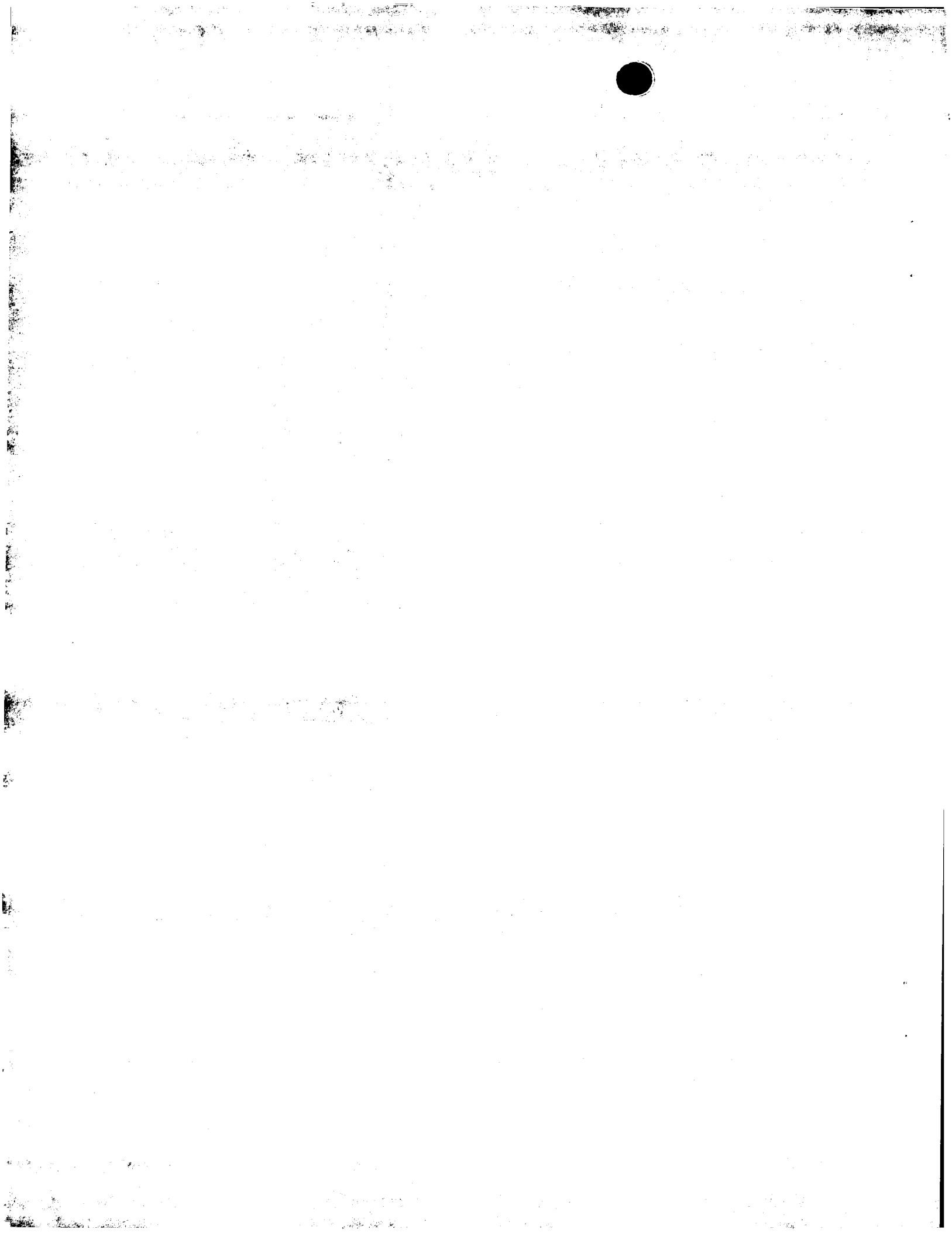


Figur 2

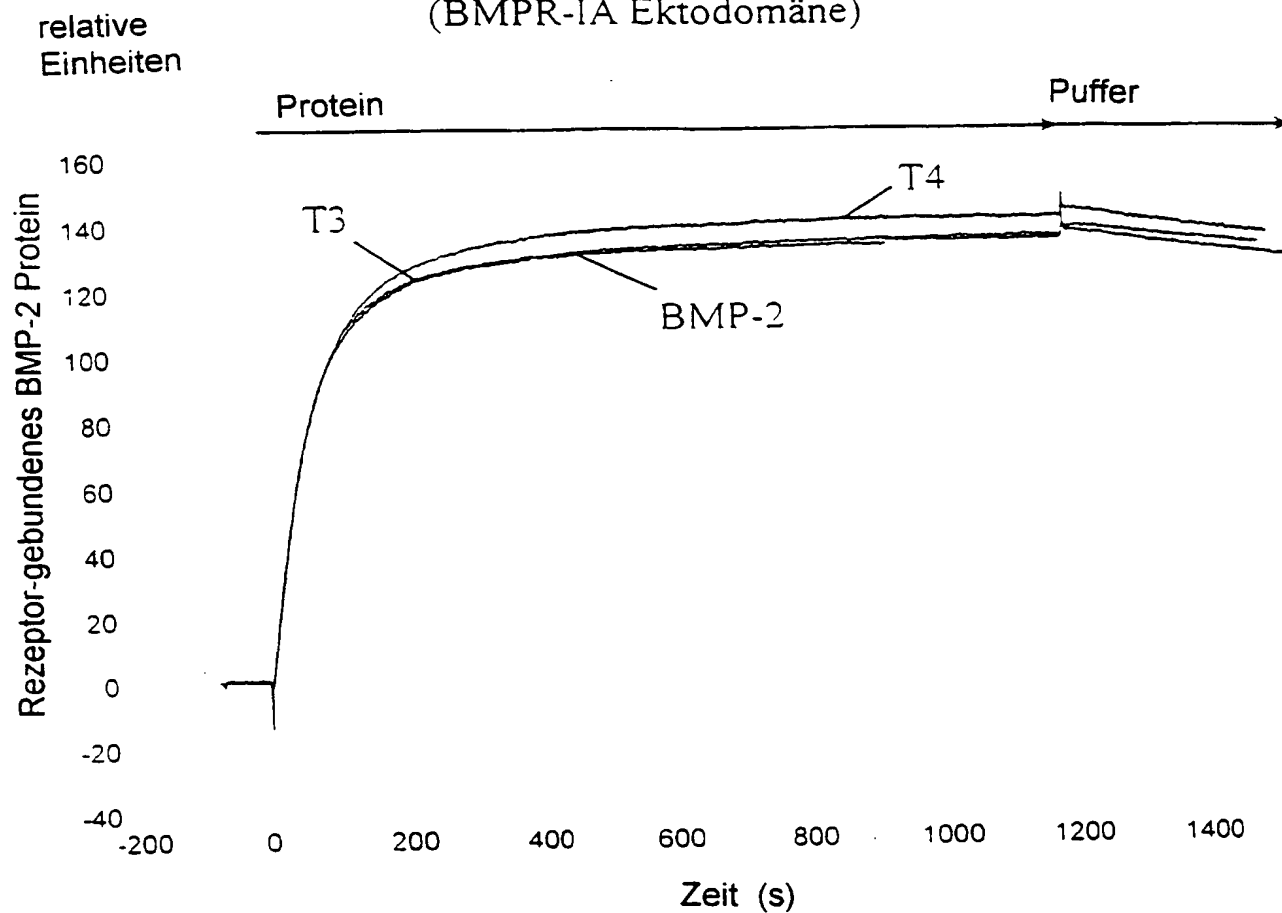


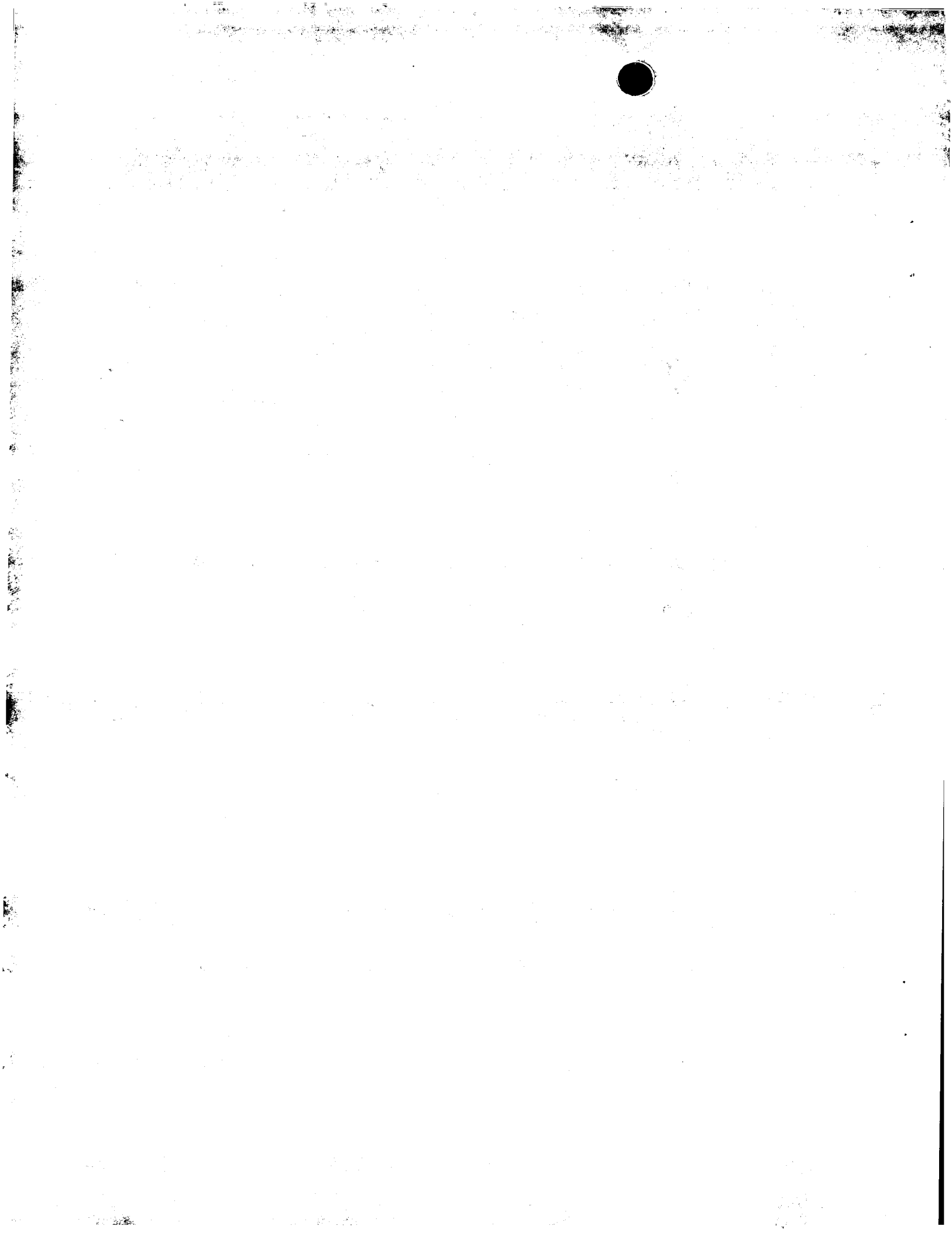
Figur 3



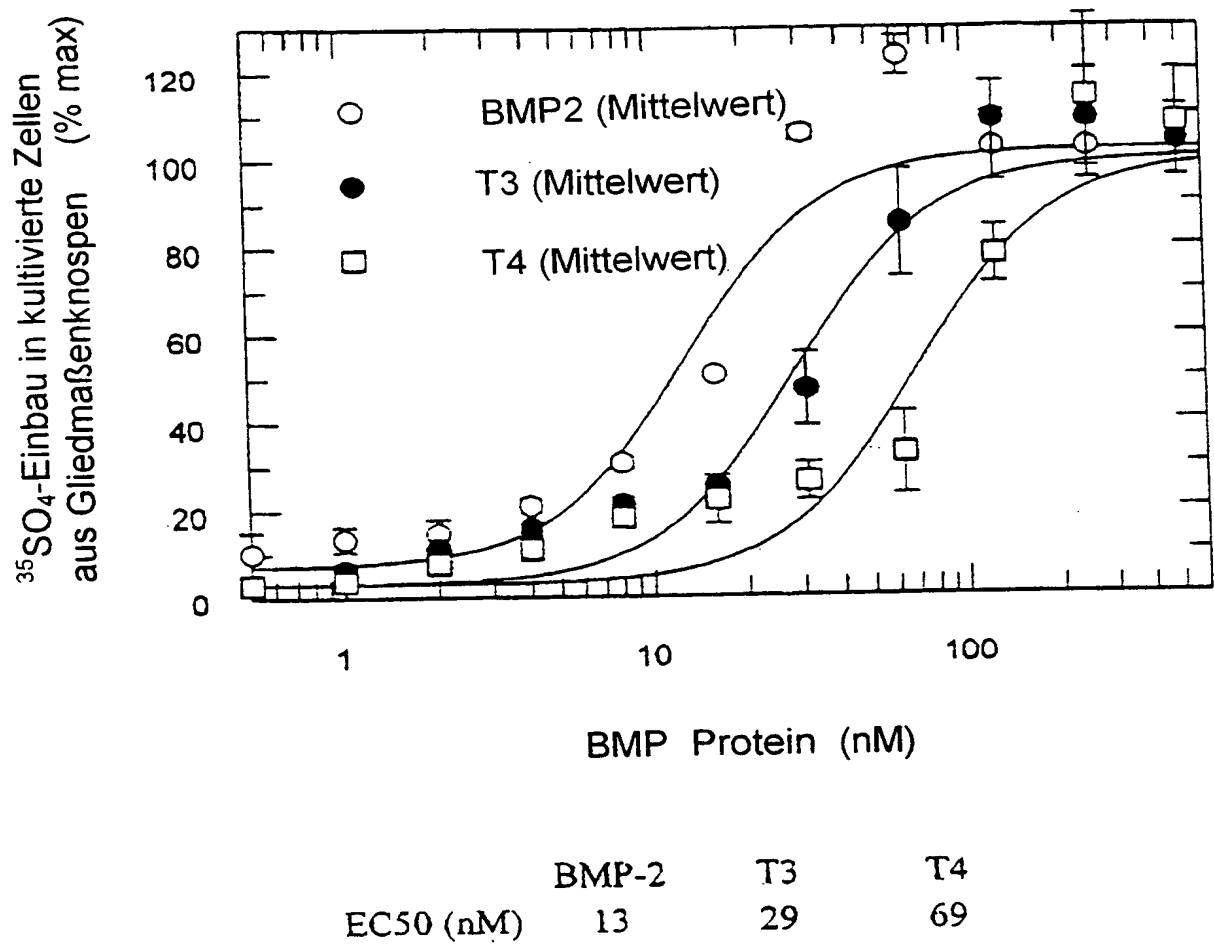


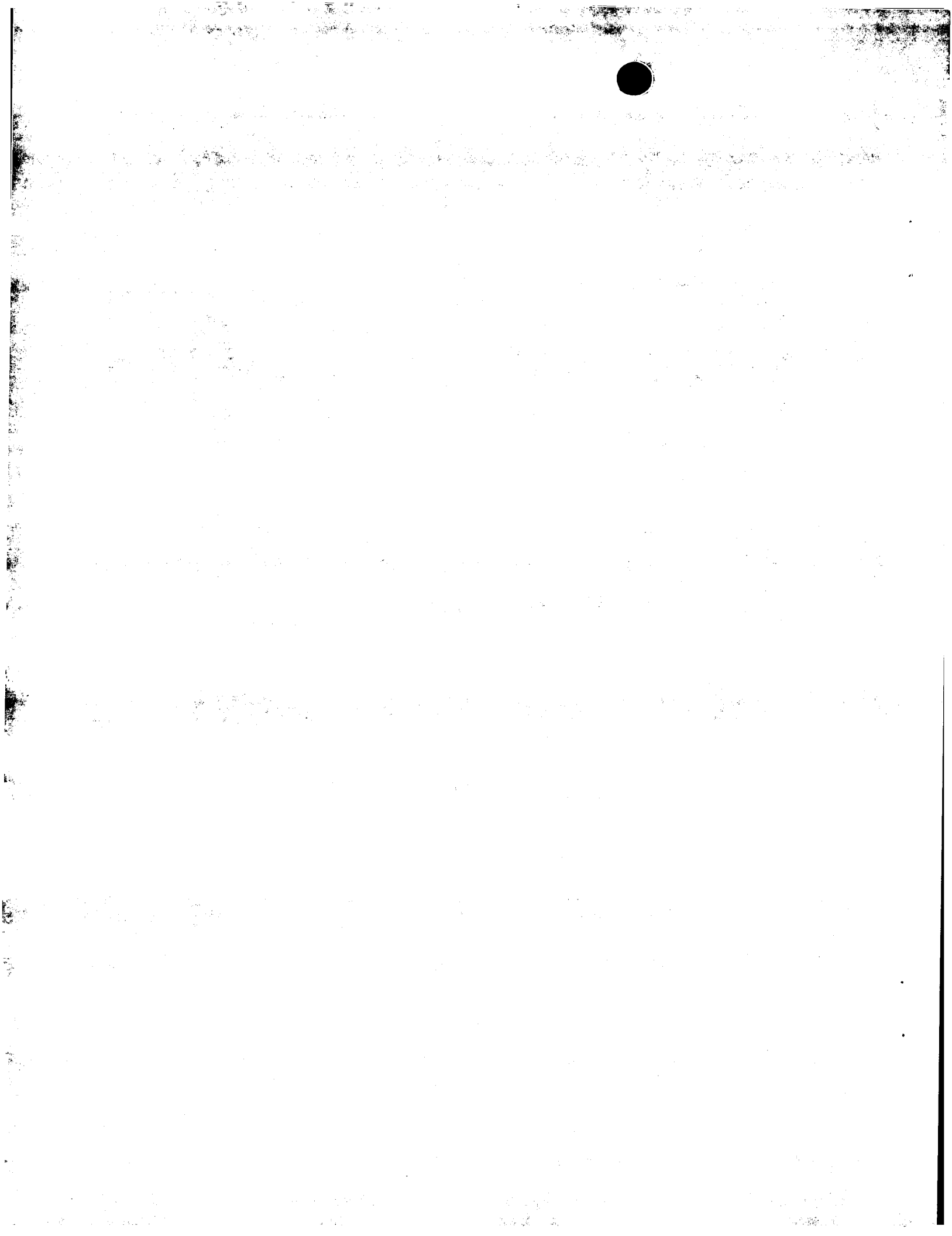
Figur 4

Rezeptorbindung von BMP-2 Varianten
(BMPR-IA Ektodomäne)

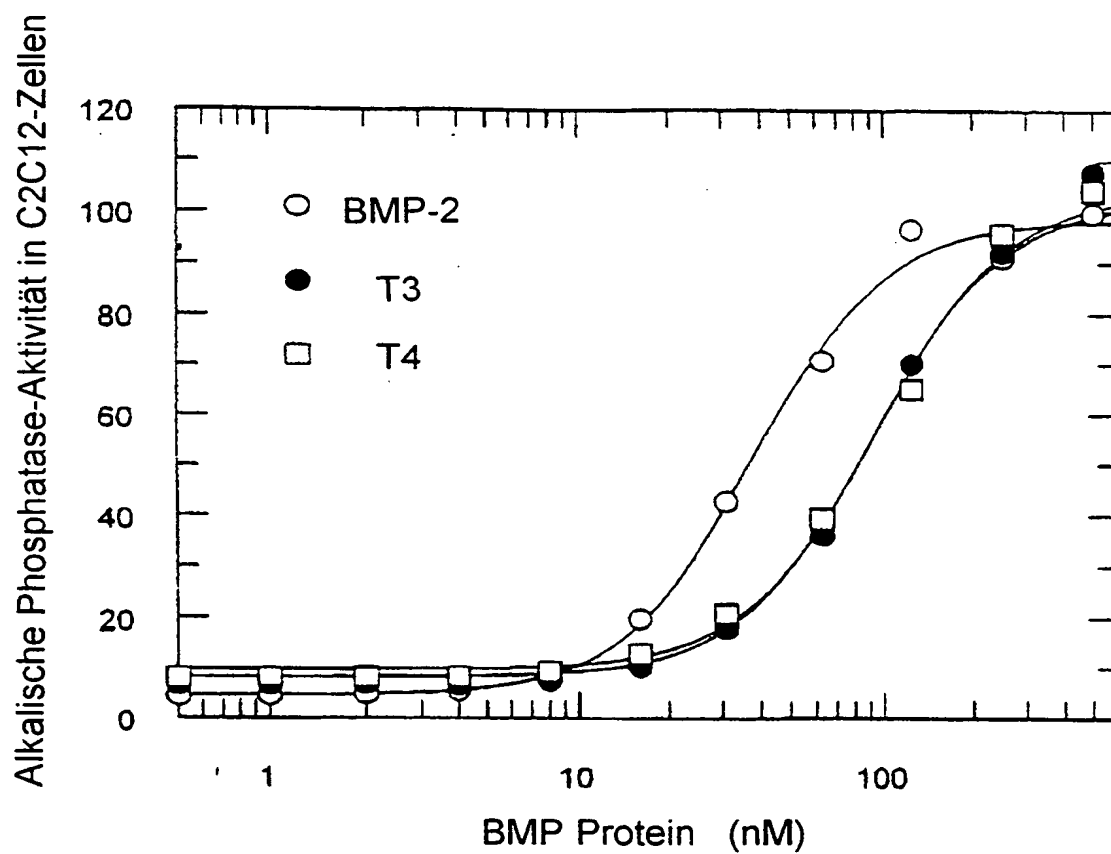


Figur 5





Figur 6

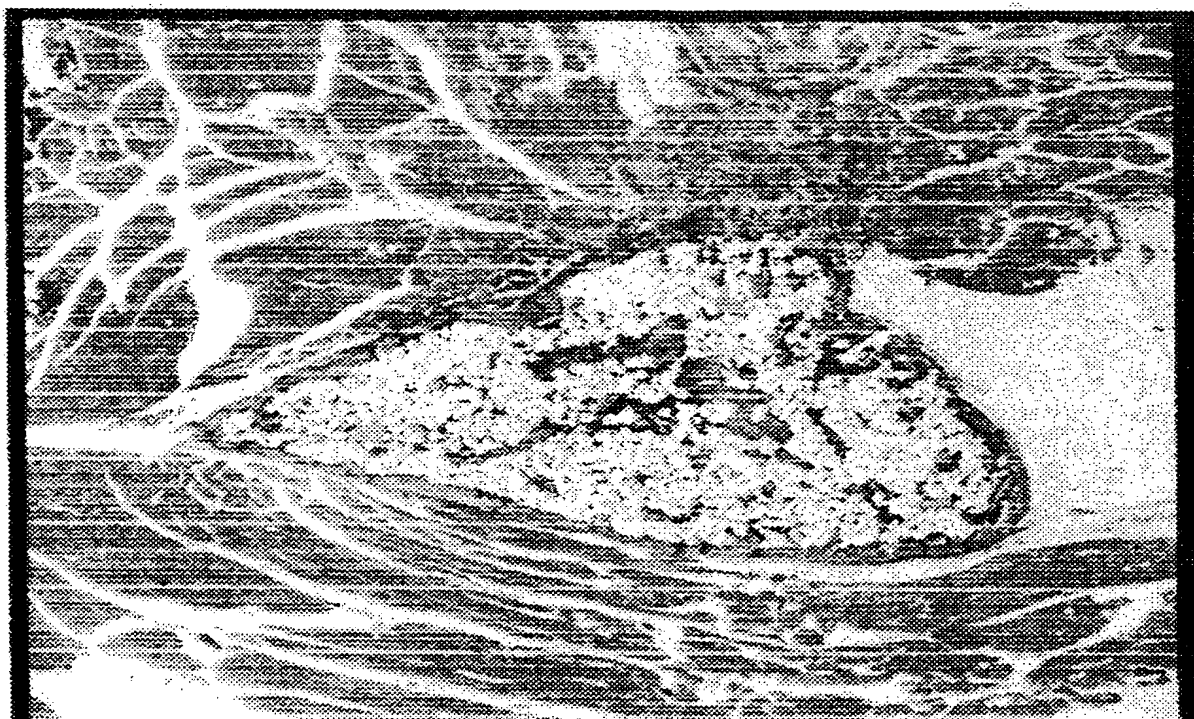


	BMP-2	T3	T4
EC50 (nM)	38	91	95

Figur 7



a

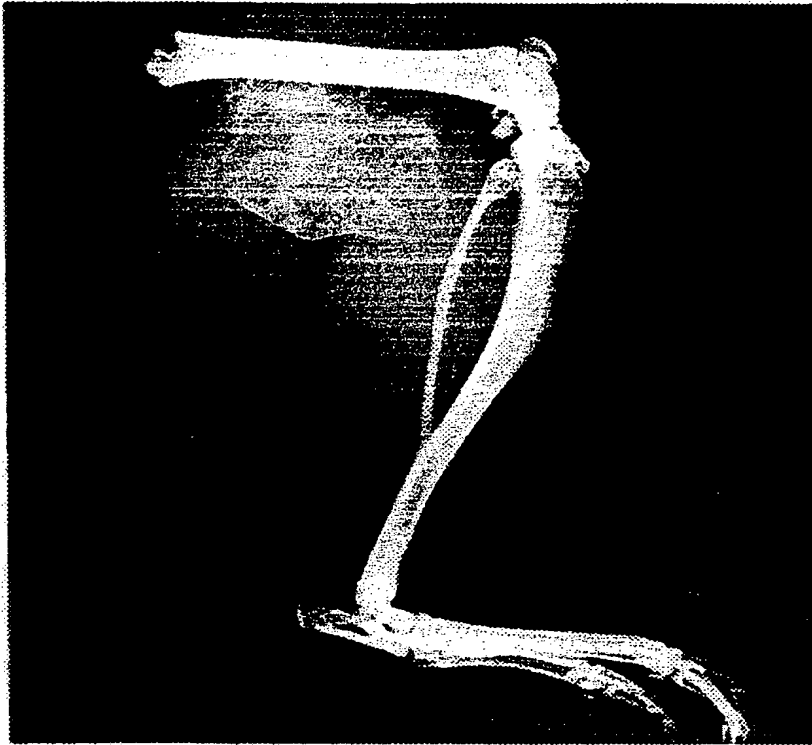


b

Figur 8



Figur 9



Figur 10



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Sebald, Walter

<120> Polypeptidvarianten mit erhöhter
Heparin-Bindungsfähigkeit

<130> PCT1126-01996

<140>
<141>

<150> DE 199 06 096.7
<151> 1999-02-13

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<221> MUTAGEN
<222> (1)
<223> K, R oder H

<220>
<221> MUTAGEN
<222> (2)
<223> K, R oder H

<220>
<221> MUTAGEN
<222> (3)
<223> K, R, H oder keine Aminosäure

<220>
<221> MUTAGEN
<222> (4)
<223> kein K, R, H, sonst beliebige Aminosäure

<220>
<221> MUTAGEN
<222> (5)
<223> kein K, R, H, sonst beliebige oder keine
Aminosäure

<220>
<221> MUTAGEN
<222> (6)
<223> kein K, R, H, sonst beliebige oder keine
Aminosäure

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Künstliche
Sequenz

<400> 1
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 2
<211> 6
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Künstliche
Sequenz

<220>
<221> MUTAGEN
<222> (1)
<223> K, R oder H

<220>
<221> MUTAGEN
<222> (2)
<223> kein K, R, H, sonst beliebige Aminosäure

<220>
<221> MUTAGEN
<222> (3)
<223> K, R oder H

<220>
<221> MUTAGEN
<222> (4)
<223> kein K, R, H, sonst beliebige Aminosäure

<220>
<221> MUTAGEN
<222> (5)
<223> kein K, R, H, sonst beliebige oder keine
Aminosäure

<220>
<221> MUTAGEN
<222> (6)
<223> kein K, R, H, sonst beliebige oder keine
Aminosäure

<400> 2
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 3
<211> 4
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Heparin-Bindungssequenz

<400> 3

Arg Lys Arg Ala

1

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Heparin-Bindungssequenz

<400> 4

Arg Lys Arg Ala Lys His Lys Gln

1

5

<210> 5

<211> 120

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: T3

<400> 5

Met Ala Gln Ala Lys His Lys Gln Arg Lys Arg Ala Arg Lys Arg Leu

1

5

10

15

Lys Ser Ser Cys Lys Arg His Pro Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val

20

25

30

Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr His Ala Phe Tyr

35

40

45

Cys His Gly Glu Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr

50

55

60

Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Lys Ile

65

70

75

80

Pro Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu

85

90

95

Tyr Leu Asp Glu Asn Glu Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Asp Met

100

105

110

Val Val Glu Gly Cys Gly Cys Arg

115

120

<210> 6

<211> 124

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:T4

<400> 6

Met Ala Gln Ala Lys His Lys Gln Arg Lys Arg Ala Lys His Lys Gln
 1 5 10 15

Arg Lys Arg Leu Lys Ser Ser Cys Lys Arg His Pro Leu Tyr Val Asp
 20 25 30

Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr
 35 40 45

His Ala Phe Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His
 50 55 60

Leu Asn Ser Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val
 65 70 75 80

Asn Ser Lys Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala
 85 90 95

Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu Asn Glu Lys Val Val Leu Lys Asn
 100 105 110

Tyr Gln Asp Met Val Val Glu Gly Cys Gly Cys Arg
 115 120

<210> 7

<211> 374

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:T3
 (Nukleinsäuresequenz)

<400> 7

ccatggctca agccaaacac aaacagcgga aacgcgctcg taaacgtctt aagtcagct 60
 gtaagagaca ccctttgtac gtggacttca gtgacgtggg gtggaatgac tggattgtgg 120
 ctccccggg gtatcacgcc ttttactgcc acggagaatg cccttttcct ctggctgata 180
 atctgaactc cactaatcat gccattgttc agacgttggg caactctgtt aactctaaga 240
 ttcctaaggc atgctgtgtc ccgacagaac tcagtgttat ctgatgctg taccttgacg 300
 agaatgaaaa ggttgattta aagaactatc aggacatggt tgtggagggt tgtgggtgtc 360
 gctagtaagg atcc 374

<210> 8

<211> 386

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: T4
 (Nukleinsäuresequenz)

<400> 8

ccatggctca agccaaacac aaacagcgga aacgcgctaa gcataagcaa cgtaagcgctc 60

ttaagtccag ctgtaagaga caccctttgt acgtggactt cagtgcgctg ggggtggaatg 120
actggattgt ggctcccccg gggatatcacg ccttttactg ccacggagaa tgcccttttc 180
ctctggctga tcacttgaac tccactaatc atgccattgt tcagacgttg gtcaactctg 240
ttaactctaa gattcctaag gcatgctgtg tcccgcacaga actcagtgtc atctcgatgc 300
tgtaccttga cgagaatgaa aagggtgtat taaagaacta tcaggacatg gttgtggagg 360
gttgtgggtg tcgctagtaa ggatcc 386

<210> 9

<211> 47

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: künstlich

<400> 9

catggctcaa gccaaacaca aacagcggaa acgcgctcgt aaacgtc 47

<210> 10

<211> 47

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: künstlich

<400> 10

ttaagacgtt tacgagcgcg ttccgctgt ttgtgtttgg cttgagc 47

<210> 11

<211> 59

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: künstlich

<400> 11

catggctcaa gccaaacaca aacagcggaa acgcgctaag cataagcaac gtaagcgtc 59

<210> 12

<211> 59

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: künstlich

<400> 12

ttaagacgct tacgttgctt atgcttagcg cgtttccgct gtttgtgttt ggcttgagc 59

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/00637

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 C12N15/62 C12N5/10 C07K14/51 C07K7/08
A61K38/18 A61K31/70 A61P19/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RUPPERT R. ET AL.: "Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity" EUR. J. BIOCHEM., vol. 237, 1996, pages 295-302, XP000891887 cited in the application the whole document	1,2, 4-12, 14-29
A	---	3,13
X	WO 97 47312 A (COMW BIOTECHNOLOGIES INC) 18 December 1997 (1997-12-18) abstract claims 1-21 --- -/-	1,2, 4-12, 14-29

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 April 2000

Date of mailing of the international search report

03/05/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Galli, I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Patent Application No.

PCT/EP 00/00637

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FROMM J.R. ET AL.: "Differences in the interaction of heparin with arginine and lysine and the importance of three basic amino acids in the binding of heparin to acidic fibroblast growth factor." ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, vol. 323, no. 2, 10 November 1995 (1995-11-10), pages 279-287, XP000891918 table 1	1,2, 4-12, 14-29
X	ALBERDI E. ET AL.: "Pigment epithelium-derived factor (PEDF) binds to glycosaminoglycans: analysis of the binding site" BIOCHEMISTRY, vol. 37, 1998, pages 10643-10652, XP002135602 figure 8	1,2, 4-12, 14-29
X	EP 0 414 915 A (SUNTORY LTD ;INOUE MASAYASU (JP)) 6 March 1991 (1991-03-06) the whole document	1,2, 4-12, 14-29
A	WO 91 18558 A (CREATIVE BIOMOLECULES INC) 12 December 1991 (1991-12-12) abstract	29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/00637

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Note: Although claim no. 27 relates to a method for the treatment of the human/animal body the search was carried out with respect to, and was based on, the stated effects of the compound/composition, provided it would be possible to carry out a search for same.
2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See supplemental sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

Field I.2 (continued)

The valid patent claims nos. 1, 2, 4-12, 14-29 relate to a disproportionately large number of possible polypeptides of which only a small portion can be supported by the description under the terms of Article 6 of the PCT and/or can be considered as disclosed under the terms of Article 5 of the PCT. In the case in question the patent claims lack the corresponding support and the patent application lacks the necessary disclosure to such a degree that a meaningful search with respect to the entire scope of protection sought appears impossible. As a result the search was directed towards those parts of the patent claims which appear supported and disclosed in the above sense, i.e. the parts relating to the polypeptides RKRA and RKRAKHKQ (see patent claims 3, 13).

The applicant is reminded that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1 (e) PCT). As a general rule, the EPO in its capacity as the authority entrusted with the task of carrying out an international preliminary examination will not conduct a preliminary examination for subjects in respect of which no search has been provided. This also applies to cases where the patent claims were amended after receipt of the international search report (Article 19 PCT) or to cases where the applicant provides new patent claims in keeping with the procedure mentioned in Chapter II of the PCT.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/00637

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9747312 A	18-12-1997	US 5877153 A AU 3216797 A CA 2257614 A EP 0907368 A	02-03-1999 07-01-1998 18-12-1997 14-04-1999
EP 0414915 A	06-03-1991	DE 69027383 D DE 69027383 T WO 9010694 A	18-07-1996 14-11-1996 20-09-1990
WO 9118558 A	12-12-1991	US 5645591 A AT 132043 T AU 639574 B AU 7961491 A CA 2082946 C DE 69115934 D DE 69115934 T DK 608211 T EP 0608211 A ES 2081484 T GR 3019339 T JP 2679409 B JP 6505642 T	08-07-1997 15-01-1996 29-07-1993 31-12-1991 10-12-1996 08-02-1996 23-05-1996 13-05-1996 03-08-1994 01-03-1996 30-06-1996 19-11-1997 30-06-1994

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/00637

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/12 C12N15/62 C12N5/10 C07K14/51 C07K7/08
A61K38/18 A61K31/70 A61P19/08

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K A61P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	RUPPERT R. ET AL.: "Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity" EUR. J. BIOCHEM., Bd. 237, 1996, Seiten 295-302, XP000891887 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1,2, 4-12, 14-29
A		3,13
X	WO 97 47312 A (COMMW BIOTECHNOLOGIES INC) 18. Dezember 1997 (1997-12-18) Zusammenfassung Ansprüche 1-21	1,2, 4-12, 14-29



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abchlusses der internationalen Recherche

13. April 2000

Abmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

03/05/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Galli, I

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>FROMM J.R. ET AL.: "Differences in the interaction of heparin with arginine and lysine and the importance of three basic amino acids in the binding of heparin to acidic fibroblast growth factor." ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, Bd. 323, Nr. 2, 10. November 1995 (1995-11-10), Seiten 279-287, XP000891918 Tabelle 1</p>	1,2, 4-12, 14-29
X	<p>ALBERDI E. ET AL.: "Pigment epithelium-derived factor (PEDF) binds to glycosaminoglycans: analysis of the binding site" BIOCHEMISTRY, Bd. 37, 1998, Seiten 10643-10652, XP002135602 Abbildung 8</p>	1,2, 4-12, 14-29
X	<p>EP 0 414 915 A (SUNTORY LTD ;INOUE MASAYASU (JP)) 6. März 1991 (1991-03-06) das ganze Dokument</p>	1,2, 4-12, 14-29
A	<p>WO 91 18558 A (CREATIVE BIOMOLECULES INC) 12. Dezember 1991 (1991-12-12) Zusammenfassung</p>	29

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl Anspruch 27 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung, vorausgesetzt, dass diese überhaupt recherchierbar ist.
2. ☒ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
sie Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: _____

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Die geltenden Patentansprüche 1,2,4-12,14-29 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Polypeptide, von denen sich nur ein kleiner Anteil im Sinne von Art. 6 PCT auf die Beschreibung stützen und/oder als im Sinne von Art. 5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann. Im vorliegenden Fall fehlt den Patentansprüchen die entsprechende Stütze und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend Polypeptide RKRA und RKRAKHKQ (siehe Patentansprüche 3,13)

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/00637

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9747312 A	18-12-1997	US 5877153 A	02-03-1999
		AU 3216797 A	07-01-1998
		CA 2257614 A	18-12-1997
		EP 0907368 A	14-04-1999
EP 0414915 A	06-03-1991	DE 69027383 D	18-07-1996
		DE 69027383 T	14-11-1996
		WO 9010694 A	20-09-1990
WO 9118558 A	12-12-1991	US 5645591 A	08-07-1997
		AT 132043 T	15-01-1996
		AU 639574 B	29-07-1993
		AU 7961491 A	31-12-1991
		CA 2082946 C	10-12-1996
		DE 69115934 D	08-02-1996
		DE 69115934 T	23-05-1996
		DK 608211 T	13-05-1996
		EP 0608211 A	03-08-1994
		ES 2081484 T	01-03-1996
		GR 3019339 T	30-06-1996
		JP 2679409 B	19-11-1997
		JP 6505642 T	30-06-1994

